

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR
SÉBASTIEN BIGRAS

IMPORTANCE DE L'HORMONE DE CROISSANCE DANS LE POLYMORPHISME
TROPHIQUE DU GRAND CORÉGONE (*Coregonus clupeaformis*, MITCHILL)

SEPTEMBRE 2005

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

COMITÉ D'ÉVALUATION

Superviseure :

**Hélène Glémet (Ph.D.)
Professeur, Département de Chimie-Biologie
Université du Québec à Trois-Rivières
Trois-Rivières, Canada**

Autres membres du comité d'évaluation :

**Guy Samson (Ph.D.)
Professeur, Département de Chimie-Biologie
Université du Québec à Trois-Rivières
Trois-Rivières, Canada**

**Maria-Grazia Martinoli (Ph.D.)
Professeur, Département de Chimie-Biologie
Université du Québec à Trois-Rivières
Trois-Rivières, Canada**

RÉSUMÉ

Jusqu'à maintenant, peu d'études ont tenté de comprendre les facteurs physiologiques spécifiques responsables de la promotion et du maintien du polymorphisme trophique chez les poissons. Dans la présente étude, nous avons investigué le rôle de l'hormone de croissance (GH) sur la détermination des différences de tailles présentées par les écotypes nain et normal du grand corégone, *Coregonus clupeaformis*. Des différences possibles en GH plasmatique, GH hépatique (mesure des récepteurs du foie), ainsi que l'expression hépatique des récepteurs (ARNm GHR) entre les nain et normal ont été étudiées en relation avec leurs taux de croissance. On a étudié des individus 1+ élevés en laboratoire (nains purs, normaux purs et hybrides) et des individus matures sexuellement provenant du milieu naturel.

Aucune différence dans le GH plasmatique n'a été trouvée ni entre des individus 1+ élevés en laboratoire, ni entre les individus sexuellement matures provenant du milieu naturel, et ce, malgré leurs différences de taux de croissance. Chez les poissons élevés en laboratoire, les individus normaux avaient un taux de croissance plus élevé que celui des nains entre 12 et 20 mois. Ce patron est inverse de celui des 0+ (croissance des nains plus élevée par rapport au normaux) mais concorde avec celui reporté dans la littérature pour les écotypes matures sexuellement. Notre étude est la première à démontrer un renversement du patron de croissance entre les 0+ et 1+, et cela à 12 mois.

Des bas niveaux de GH hépatique de même que de faibles expressions des récepteurs à GH (GHR) chez les nains du milieu naturel suggèrent la possibilité d'une insensibilité à la GH. L'absence de différences pour les mêmes mesures entre les groupes élevés en laboratoire pourrait être attribuable au fait que l'inversion du patron de croissance est relativement récente, laissant trop peu de temps pour établir des différences de niveaux GHR. On remarque une cohérence entre les bas niveaux de GH hépatique observés chez les nains du milieu naturel et une forme de nanisme reliée à l'insensibilité à la GH affectant certains vertébrés. En effet, le syndrome d'insensibilité à la GH pourrait être le mécanisme régulateur de la croissance responsable de la

promotion des importantes différences de tailles associées au polymorphisme trophique que l'on retrouve chez le grand corégone.

Mots-clés : Hormone de croissance, taux de croissance, grand corégone, *Coregonus clupeaformis*, récepteurs à hormone de croissance, polymorphisme trophique, résistance à la GH.

AVANT-PROPOS

i) Conformité du manuscrit

Le document suivant présente, conformément aux articles D45-46-47 du règlement de cycles supérieurs de l'Université du Québec à Trois-Rivières, les résultats obtenus dans le cadre du programme de maîtrise en Sciences de l'Environnement sous forme d'article scientifique.

Le chapitre I est consacré à une revue de littérature exhaustive concernant le polymorphisme trophique, le grand corégone et l'hormone de croissance ainsi que quelques facteurs régulant la production de cette dernière.

Le chapitre II de ce mémoire est un résumé substantiel de l'article présenté en anglais au chapitre III. Le chapitre II consiste en une introduction suivie des objectifs, du matériel et des méthodes utilisés, des résultats obtenus, de la discussion de ces résultats et des conclusions et perspectives futures. Une liste de références bibliographiques des chapitres I et II suit immédiatement ce dernier.

Le chapitre III consiste en un article scientifique intitulé « Importance of growth hormone (GH) for trophic polymorphism of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*): GH regulation in dwarf and normal ecotypes » dont les auteurs sont Sébastien Bigras et Hélène Glémet. Le manuscrit sera soumis dans un futur proche au périodique Comparative Biochemistry and Physiology pour fin de publication. Les instructions relatives à la publication d'articles scientifiques dans ce journal peuvent être trouvées à l'annexe I.

ii) Remerciements

Je remercie Hélène Glémet pour m'avoir confié ce projet et pour avoir accepté de me guider tout au long de sa réalisation. Même si ce ne fut pas facile tous les jours, son amour du métier de chercheur a su éveiller en moi une vive passion pour la recherche. À toi Hélène, merci beaucoup. Je remercie également Fatiha Boulemkahel pour son assistance bien précieuse en laboratoire pour l'élaboration et la mise au point de certains protocoles. Une mention particulière à Pierre East et Gaston Lacroix pour le temps consacré et les efforts fournis lors des campagnes d'échantillonnage. Je ne voudrais pas oublier Nancy Gagner qui a pris bien soin des poissons dans le laboratoire humide.

Olivier Côté a également grandement contribué à l'aboutissement du projet en effectuant mes dernières manipulations de laboratoires pendant que je rédigeais. Sans lui, je serais encore en train d'effectuer des manipulations. Un énorme merci. Je voudrais également remercier mes collègues de travail avec qui j'ai eu beaucoup de bons moments dont Isabelle Villemure, Hélène Berthelot, Derek Tardif, Julie Ayotte et Bidénam Kakou, ainsi que les membres du GRÉA avec qui j'ai échangé sur ce projet, particulièrement Sébastien Rouleau et Yves Paradis pour les cours éclairés en statistique.

Je souhaite dire merci à Maria-Gazia Martinoli, Andrea Bertolo, Guy Samson et à Pierre Magnan pour avoir accepté d'être sur mon comité d'orientation et/ou d'évaluation de mémoire et/ou de séminaire.

Je ne peux oublier SAM et MC pour leur support moral et leur amitié et le temps consacré à rendre ma tâche moins complexe. Je vous en dois pas mal pour ça !

Une mention spéciale à ma famille qui, par leurs encouragements et leur confiance indéfectible a permis la rédaction de ce document. Un merci tout spécial à mes parents, Normand et Lise, pour m'avoir encouragé tout au long de mes études et avoir toujours crû en moi.

Merci beaucoup à tous !

TABLES DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	ii
AVANT-PROPOS.....	iv
i) Conformité du manuscrit.....	iv
ii) Remerciements.....	v
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
 CHAPITRE I : REVUE DE LITTÉRATURE.....	 1
1.1 Le polymorphisme trophique.....	2
1.2 Le grand corégone.....	5
1.3 L'hormone de croissance.....	9
1.4 Le métabolisme du glucose.....	15
 CHAPITRE II : RÉSUMÉ SUBTANTIEL DE L'ARTICLE.....	 19
2.1 Introduction.....	20
2.2 Objectifs.....	23
2.3 Matériel et méthodes.....	24
2.3.1 Origine des poissons et échantillonnage.....	24
2.3.2 Quantification de l'hormone de croissance (GH).....	25
2.3.3 Quantification du message des récepteurs de GH (ARNm GHR).....	26
2.3.4 Quantification du glucose plasmatique.....	27
2.3.5 Analyses statistiques.....	27
2.4 Résultats.....	29
2.4.1 Taux de croissance.....	29
2.4.2 Niveaux de GH plasmatique.....	29
2.4.3 Niveaux de glucose plasmatique.....	29
2.4.4 Niveaux de GH hépatique.....	29
2.4.5 Niveaux d'expression de GHR.....	29

2.4.6 Facteur de condition.....	30
2.5 Discussion.....	31
2.5.1 Taux de croissance.....	31
2.5.2 Régulation de la croissance par l'axe GH-IGF-I.....	32
2.6 Conclusion et perspectives futures.....	35
BIBLIOGRAPHIE DE LA SECTION FRANCOPHONE.....	36
CHAPITRE III : Importance of growth hormone (GH) for trophic polymorphism of lake whitefish (<i>Coregonus clupeaformis</i>): GH regulation in dwarf and normal ecotypes.....	47
Title Page.....	48
Abstract.....	49
Introduction.....	50
Material and methods.....	53
Results.....	58
Discussion.....	60
Acknowledgement.....	65
References.....	66
ANNEXE I : Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology Guide for authors.....	78

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1	Nombre d'échantillons pour chacune des mesures.....	28
Tableau 3.1	Morphometric measurements, coefficient factor and growth rate of different lake whitefish individuals used for this study.....	72

LISTE DE FIGURES

1.1	Grands corégonos de formes normale et naine à maturité.....	7
1.2	Structure schématique de l'hormone de croissance.....	11
1.3	Schéma de la biochimie du glucose avec la glycolyse et le cycle de Krebs.....	16
3.1	Growth rate of laboratory-raised <i>C. clupearformis</i> groups during their second year (from 12 to 20 months) of growth.....	73
3.2	Plasma growth hormone (GH) levels of 20 month-old laboratory-raised groups and of mature wild ecotypes of <i>C. clupearformis</i>	74
3.3	Plasma glucose levels of 20 months-old laboratory-raised groups and of mature wild ecotypes of <i>C. clupearformis</i>	75
3.4	Hepatic growth hormone (GH) levels of 20 months-old laboratory-raised groups and of mature wild ecotypes of <i>C. clupearformis</i>	76
3.5	Hepatic growth hormone receptor (GHR) mRNA levels: Amplifications on agarose gel and hepatic GHR mRNA levels of 20 months-old laboratory-raised groups and of mature wild ecotypes of <i>C. clupearformis</i>	77

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Dans cette section, une description bilingue des abréviations utilisées dans les sections francophone et anglophone du manuscrit vous est fournie. Afin de faciliter la consultation de cette liste, l'ordre alphabétique a été préféré à l'ordre d'apparition dans le texte.

ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ARNm	acide ribonucléique messenger
CF	facteur de condition / condition factor
GH	hormone de croissance / growth hormone
GHR	récepteurs à hormone de croissance / growth hormone receptors
HK	hexokinase
HSD	différence honnêtement significative / honestly significant difference
IGF-I	facteur de croissance analogue à l'insuline I / insulin like growth factor I
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide
pb	paires de base
PBS	phosphate buffer saline
PCR	réaction de polymérisation en chaîne / polymerase chain reaction
RT-PCR	transcription inverse suivie de réaction de polymérisations en chaîne / reverse transcription - polymerase chain reaction
UV	ultra-violet

CHAPITRE I

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Le polymorphisme trophique

1.1.1 Aspects généraux

1.1.1.1 Habitudes alimentaires et exploitation de l'habitat

Le polymorphisme trophique ou de ressource est hautement corrélé avec les habitudes alimentaires et l'exploitation de l'habitat chez les poissons d'eau douce (Schluter and McPhail, 1993; Robinson and Wilson, 1994; Skulason and Smith, 1995; Smith and Skulason, 1996). Lorsque le milieu le permet, les membres d'une même espèce de poissons se divisent habituellement selon une zone préférentielle dans le lac qui a pour effet d'influencer significativement les habitudes alimentaires des formes. Les poissons lacustres polymorphes se nourrissent généralement de façon très différente. Certains individus vont se nourrir de plancton dans la zone pélagique du lac alors que d'autres vont adopter le benthos comme nourriture de base et vont rester dans la zone littorale appelée également benthique (Smith and Skulason, 1996). Plusieurs cas de cette ségrégation sont répertoriés dans la littérature. L'épinoche à trois épines (Schluter, 1994), l'omble chevalier (Hindar and Jonsson, 1993; Skulason et al., 1996), l'omble de fontaine (Bourke et al., 1997) et le grand corégone (Bodaly, 1979; Bernatchez et al., 1996; Doyon et al., 1998) sont des exemples bien établis de cette division au niveau de leur alimentation.

La radiation des formes différentes d'une même espèce se fait généralement lorsqu'il y a présence de niches écologiques inoccupées et/ou lorsqu'il y a une grande diversité d'habitats (Skulason and Smith, 1995; Smith and Skulason, 1996). On retrouve la plupart des exemples de poissons d'eau douce présentant un polymorphisme dans les lacs de l'hémisphère nord, car ceux-ci ont été recouverts lors de la dernière glaciation (Skulason and Smith, 1995; Smith and Skulason, 1996). Ces jeunes lacs, par leurs nombreuses niches écologiques inoccupées et/ou la relative pauvreté en espèces, représentent des endroits de prédilection pour la promotion du polymorphisme trophique (Skulason and Smith, 1995; Smith and Skulason, 1996). La séparation physique d'individus de même espèce lors des glaciations a également joué un grand rôle dans l'apparition de formes distinctes au sein des espèces ichtyologiques de l'hémisphère nord. De plus, la diversité des niches écologiques peut jouer un rôle important dans

l'apparition et le maintien du polymorphisme trophique. Par exemple, les lacs d'Islande, à cause de leur topographie complexe considérant que ce sont des lacs volcaniques, présentent une grande diversité et complexité d'habitats favorisant le polymorphisme trophique chez l'omble chevalier (Smith and Skulason, 1996).

L'absence de compétition interspécifique est un autre élément promouvant le polymorphisme trophique (Skulason and Smith, 1995; Smith and Skulason, 1996). Il n'est pas surprenant de constater qu'on retrouve jusqu'à quatre formes différentes d'omble chevalier en Islande dans le même lac. En effet, parce que la compétition interspécifique est quasi inexistante, jusqu'à quatre formes d'omble chevalier se sont développées principalement puisque seulement trois espèces distinctes peuplent ces lacs (Hindar and Jonsson, 1993; Skulason et al., 1996). De plus, chez le crapet soleil (*Lepomis gibbosus*), il n'est pas rare d'observer deux formes : une se nourrissant sur sa niche habituelle (zone littorale), alors que l'autre occupe la niche du crapet arlequin (*L. macrochirus*) (zone pélagique) (Schluter and McPhail, 1993; Robinson and Wilson, 1994) lorsque ce dernier est absent. Ainsi, chez le grand corégone (*Coregonus clupeaformis*) dans les lacs de l'Amérique du nord, on retrouve l'écotype nain qu'en sympatrie avec le normal et seulement lorsque le cisco de lac (*C. artedii*), son compétiteur, est absent (Lindsey, 1981).

1.1.1.2 Différences phénotypiques

Les différences entre les formes se présentent fréquemment au niveau de la forme de la mâchoire, de la taille, de la forme et du nombre de branchiténies, de la taille et de la forme de nageoires, de la hauteur du corps et de la tête, de la structure de l'estomac et du tube digestif; des patrons de croissance, de l'âge à maturité, de l'investissement reproducteur, de la fécondité et de la taille des œufs ainsi que des comportements alimentaires et migratoires (revu par Skulason and Smith, 1995). Il existe essentiellement deux types de polymorphisme; l'un implique des différences flagrantes chez les formes tel qu'observé chez le grand corégone, tandis que l'autre est beaucoup plus subtile comme chez l'omble de fontaine (*S. fontinalis*) où l'utilisation des habitats

benthique et pélagique est liée à des différences fonctionnelles dans la morphologie de certaines structures et dans la coloration (Bourke et al., 1997; Dynes et al., 1999).

1.1.2 Mécanismes maintenant le polymorphisme trophique

1.1.2.1 Bases génétiques responsables du polymorphisme trophique

Les différences phénotypiques de poissons polymorphes peuvent être attribuables à la fois à une influence environnementale ainsi qu'à une contribution héréditaire. La proportion de chacun des deux facteurs varie d'une espèce à l'autre et même d'une population à l'autre (Smith and Skulason, 1996). L'omble chevalier est un exemple où la contribution relative des deux influences sur le phénotype varie selon la population ou le lac (Hindar and Jonsson, 1993; Skulason et al., 1996).

Bien que la plupart des formes actuellement décrites semblent stables, il existe quelques exceptions montrant une plasticité phénotypique réversible (Meyer, 1989; Meyer, 1990). En effet, on remarque que *Cichlasoma citrinellum* est capable de changement de phénotype au gré des saisons selon la source de nourriture dont dépend sa survie (Meyer, 1990). De cette observation, on peut déduire que les cas de polymorphisme apparaissant dans des environnements plus instables sont généralement attribuables à la plasticité phénotypique de l'espèce (Nordeng, 1983), alors que ceux apparaissant dans des milieux stables auraient des bases génétiques (Hori, 1993). Il est toutefois difficile de déterminer le rôle et la part de la stabilité environnementale dans la détermination du phénotype, des études à ce sujet sont requises (Smith and Skulason, 1996).

Généralement, les bases génétiques contrôlant la plupart des cas de polymorphisme trophique sont peu ou pas connues (Smith and Skulason, 1996). Par contre, le cas des cichlides du lac Tanganyika mangeurs d'écailles, a été identifié : un seul locus avec deux allèles serait impliqué dans le polymorphisme de déviation de la bouche de cette espèce (Hori, 1993). On ne peut actuellement conclure que les autres cas de polymorphisme trophique soient contrôlés par un ou plusieurs loci (Smith and Skulason, 1996).

1.1.2.2 Spéciation

Le flux génique entre les formes polymorphiques vivant en sympatrie varie grandement selon le cas et, dans la situation où il est limité, peut mener à l'apparition d'une nouvelle espèce (Foote et al., 1989; Ferguson and Taggart, 1991; Bodaly et al., 1992; Taylor and Bentzen, 1993; McVeigh et al., 1995; Taylor et al., 1996). La spéciation se produit grâce aux mécanismes post-zygotiques de sélection tels que la diminution du fitness des hybrides (Meyer, 1990; Wood and Foote, 1990; Schluter, 1995) ou aux mécanismes prézygotiques tel qu'une ségrégation spatiale et/ou temporelle lors de la reproduction et des différences aux niveaux des comportements de reproduction ou de choix de partenaire (Bodaly et al., 1988; Sigurjonsdottir and Gunnarsson, 1989; Meyer, 1990; Robinson et al., 1993; Taylor and Bentzen, 1993).

Il a été démontré expérimentalement que les hybrides issus des écotypes normal et nain du grand corégone présentent un taux de mortalité journalier des embryons de 2,7 à 4,7 fois plus importants que les formes pures (Lu and Bernatchez, 1998). L'élimination des hybrides au stade embryonnaire empêche que des lignées d'hybrides voient le jour ce qui réduit ainsi le flux génique entre les hybrides et entre ces derniers et les formes pures.

Selon Smith et Skúlason (1996), les conditions requises pour promouvoir le polymorphisme trophique auraient été réunies assez souvent pour avoir joué un très grand rôle dans la radiation des espèces, contribuant ainsi à la diversité spécifique que l'on retrouve dans les divers écosystèmes terrestres.

1.2 Le grand corégone

1.2.1 Étymologie

Le grand corégone, également appelé *Coregonus clupeaformis* (Mitchill), est un salmonidae du genre *coregonus*. Le nom latin *coregonus* vient de la combinaison de deux noms qui signifient respectivement œil et angle. On remarque en effet chez toutes les espèces de genre *coregonus* un œil proéminent dominant ainsi qu'une tête aiguë

(Scott and Crossman, 1974). Quant au terme *clupeaformis*, il veut simplement dire en forme de hareng (Scott and Crossman, 1974).

1.2.2 Distribution

Le grand corégone se retrouve en eau douce dans la région septentrionale de l'Amérique du Nord. Plus spécifiquement, sa présence a été répertoriée au Nouveau-Brunswick, au Labrador, dans tout le Québec et l'Ontario, les Grands lacs, la Baie d'Ungava, la Baie d'Hudson jusqu'à l'eau saumâtre, le Manitoba, les eaux nordiques de la Saskatchewan, l'Alberta, la Colombie-Britannique ainsi que l'Alaska et les Territoires (du Nord-Ouest et du Yukon) (Scott and Crossman, 1974). Il faut toutefois prendre en considération que le grand corégone a été introduit dans plusieurs régions telles que la Colombie-Britannique, Terre-Neuve et l'Alberta (Scott and Crossman, 1974). On le retrouve également dans certains états de l'est et du centre des États-Unis soit le Maine, le New Hampshire, le Vermont, New York et le Michigan et dans d'autres états de l'ouest et du nord tels que l'état de Washington, l'Oregon, l'Idaho, le Montana, le Wyoming, l'Utah et dans le nord du Nevada.

1.2.3 Polymorphisme trophique du grand corégone

Les exemples de polymorphisme chez les *coregonidae* ont souvent été décrits dans la littérature (Svärson, 1979; Vuorinen et al., 1981) et celui de *C. clupeaformis* ne fait pas exception (Bodaly, 1979; Bernatchez and Dodson, 1991; Bodaly et al., 1992; Foote et al., 1992; Bernatchez and Dodson, 1994; Bernatchez et al., 1996). En effet, en raison de sa large distribution à travers toute la moitié nord de l'Amérique du Nord (Scott and Crossman, 1974) ainsi qu'à cause de la facilité de distinguer les deux formes, *C. clupeaformis* est une espèce particulièrement intéressante pour l'étude des stades initiaux de la spéciation (Bernatchez and Dodson, 1991; Bodaly et al., 1991; Bernatchez et al., 1996; Doyon et al., 1996).

Les deux formes, nommées également écotypes, présentant un polymorphisme de taille flagrant, les dénominations de nains pour les poissons de petite taille et de

normaux pour ceux de grande taille, ont ainsi été adoptées (Scott and Crossman, 1974) (Fig. 1.1).

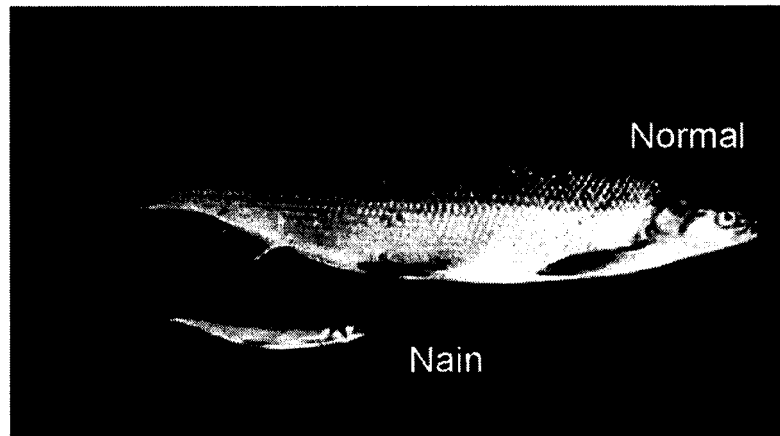


Figure 1.1 Grands corégones de formes normale et naine à maturité (L. Bernatchez).

La forme dite normale est la seule des deux formes que l'on retrouve en absence de l'autre (Pigeon et al., 1997). En effet, le grand corégon de forme normale se rencontre souvent en nature en allopatrie alors que la forme naine ne se trouve qu'en sympatrie avec la première. Aussi, il a été démontré que la forme naine n'a jamais été rencontrée en présence du cisco de lac suggérant une compétition pour la même niche (Bodaly et al., 1991; Pigeon et al., 1997; Doyon et al., 1998; Trudel et al., 2001). Selon Trudel et al. (2001), il y a plus de similitude entre l'écotype nain du grands corégones et le cisco de lac qu'entre les nains et les normaux. En effet, par l'habitat qu'ils utilisent (pélagique), par l'efficacité d'utilisation de l'énergie absorbée, par la grande quantité de nourriture ingérée et par le coût métabolique élevé, la forme naine du grand corégon et le cisco de lac sont très semblables (Trudel et al., 2001).

Les niches écologiques occupées par les deux formes de corégon sont très dissemblables (Robinson and Wilson, 1994). En effet, la forme naine occupe la zone pélagique des lacs se nourrissant uniquement de zooplanctons, alors que les normaux sont benthiques (littoraux) se nourrissant de zooplancton étant jeunes pour ensuite transférer sur les arthropodes aquatiques et petits poissons qu'ils chassent dans la zone littorale lorsqu'ils atteignent une certaine longueur (Scott and Crossman, 1974;

Robinson and Wilson, 1994; Doyon et al., 1998). Récemment il a été démontré en laboratoire que les écotypes avaient des comportements de quête alimentaire liés à leurs habitats respectifs (Rogers et al., 2002). Les nains effectuent plus de manœuvres natatoires de type «burst», plus de mouvements soudains et se tiennent plus haut dans la colonne d'eau du bassin comparativement aux normaux, suggérant une contribution certaine à leur taux de succès dans leur niche écologique respective (Rogers et al., 2002).

1.2.4 Taille et physiologie

Le grand corégone présente un polymorphisme qui se traduit par une division en deux formes se distinguant par un âge et une taille à maturité significativement différents, ainsi que par un taux de croissance également dissemblables. En effet, les individus de forme naine sont matures entre 1 et 2 ans et mesurent entre 120 et 200 mm (longueur à la fourche) comparé à ceux de forme normale qui deviennent matures entre 4 et 5 ans et mesurent entre 350 et 550 mm (Fortin and Gendron, 1990; Chouinard et al., 1996). L'écotype nain a également une espérance de vie plus courte et un taux de croissance plus faible que le normal (Fortin and Gendron, 1990; Doyon et al., 1998).

Les mécanismes impliqués dans la divergence de croissance des morphotypes nain et normal ont été peu étudiés jusqu'à maintenant. Trudel et al. (2001) ont récemment démontré que les grands corégonos de taille naine consomment 40-50% plus de nourriture que ceux de taille normale en milieu naturel. De plus, leurs travaux sur des individus matures indiquent que les nains présentent une efficacité de croissance de deux à trois fois plus faibles que celle des normaux. Par contre, une étude effectuée en laboratoire sur la croissance de jeunes larves de corégone utilisant des indices biochimiques indique que la croissance des individus nains durant la première année serait le contraire de celle à maturité, c'est-à-dire plus élevée comparé au normaux (Berthelot, 2004).

La grande différence au niveau de la taille entre les formes suggère fortement que la base génétique responsable du polymorphisme trophique chez le corégone soit liée aux facteurs physiologiques régulant la croissance.

1.2.5 Divergence et ses modes d'action

Deux modes de divergence ont été répertoriés pour *C. clupeaformis* dépendant du lac étudié. La première fait état d'une divergence allopatrique i.e. que les individus des deux formes viennent de refuges glaciers différents et que c'est un contact secondaire qui les a réunis (Bernatchez and Dodson, 1990; Bernatchez and Dodson, 1991). La preuve de ces origines séparées vient d'une analyse phylogénétique de l'ADN mitochondrial (ADNmt) des deux formes trouvées dans le lac Cliff (Maine, USA), qui confirme qu'elles étaient divisées pendant la dernière glaciation dans des refuges glaciers distincts : l'Acadien et l'Atlantique (Bernatchez and Dodson, 1990; Bernatchez and Dodson, 1991).

Le second mode de divergence serait une ségrégation des écotypes ayant évolués en sympatrie (Chouinard et al., 1996). Le lac de l'Est (Québec, Canada) serait un endroit où la divergence aurait suivi cette voie expliquant en partie l'origine glacière unique des individus des deux formes retrouvées dans ce lac (Chouinard et al., 1996). En effet, seule la race Acadienne y est retrouvée (Bernatchez and Dodson, 1990; Pigeon et al., 1997). Aussi, les patrons d'ADNmt (ADN mitochondrial) communs pour les formes ne semblent pas s'être rencontrés fréquemment : malgré l'exhaustivité des études à ce sujet (Bernatchez et Dodson 1991; Bernatchez and Dodson, 1991; Bernatchez and Dodson, 1994), seul le lac Caniapiscau présente des patrons d'ADNmt monophylétique mais pour la race Mississippienne (Pigeon et al., 1997).

1.3 L'hormone de croissance

La croissance chez les poissons est régulée entre autres par les hormones neuroendocriniennes venant de l'axe formé par l'hormone de croissance (GH) et le facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF) (Duan and Plisetskaya, 1993; Peng and Peter, 1997). De plus, une étude de Perez-Sanchez et al. (1992) montre la régulation par *feedback* existant entre l'IGF-I et la GH. En effet, l'augmentation de l'IGF sanguin abaisse le relâchement de la GH dans le sang tandis qu'un traitement avec de la GH exogène augmente l'activité de l'IGF (Perez-Sanchez, 2000). Plusieurs facteurs entrent dans le contrôle de la sécrétion de la GH, certains stimulant cette sécrétion et d'autres

l'inhibant (Peng and Peter, 1997). Aussi, il existe un lien important entre la quantité de nourriture ingérée et la sécrétion de la GH (Duan and Plisetskaya, 1993; Peng and Peter, 1997). À cause du rôle important de la GH sur la croissance des tissus mous et squelettiques des vertébrés (Prosser, 1991), cette section fera une brève revue des plus importants facteurs influençant la sécrétion de la GH.

1.3.1 Généralités, origine et structure chimique

L'hormone de croissance (GH) est une hormone polypeptidique synthétisée et sécrétée par des cellules spéciales de la glande pituitaire situées dans la partie proximale de la *pars distalis* (Perez-Sanchez, 2000). Elle fait partie de la famille des hormones prolactines (Prosser, 1991) ou lactogéniques (Seo, 1985) avec la prolactine (PRL) et le lactogène placentaire (PL). Cette famille d'hormone a, chez les vertébrés, une grande homologie dans la séquence d'acides aminés bien que leurs fonctions diffèrent dans la phylogénèse (Niall et al., 1971; Niall et al., 1973; Wallis, 1975).

La GH des vertébrés est une chaîne simple de peptides comprenant entre 190 acides aminés (habituellement 191 chez l'humain) jusqu'à plus de 200 (environ 230 chez le saumon du Pacifique, *Oncorhynchus nerka*) et pesant entre 21 et 24 kDa (Prosser, 1991). La GH a été extraite d'espèces provenant de tous les embranchements des vertébrés à l'exception des agnathes (Gorbman, 1980; Wendelaar Bonga, 1993). Bien que les peptides de la GH aient été séquencés pour plusieurs de ces vertébrés, la plupart des études ayant lieu avant le milieu des années 80 qui portaient sur la sécrétion et les actions de cette dernière étaient effectuées sur les mammifères (Peng and Peter, 1997). On a remarqué qu'il existait des similitudes de l'ordre de 30 à 35% entre la GH des téléostéens et celle des humains, alors que pour les poissons plus primitifs (anguille et esturgeon), cette similitude monte jusqu'à 50 à 70% (Perez-Sanchez, 2000). Il a été démontré que quatre domaines étaient conservés et que la structure de la GH renferme deux ponts di sulfure ayant un rôle important dans la liaison de la protéine GH avec son récepteur (Fig. 1.2) (Grigorian et al., 2005).

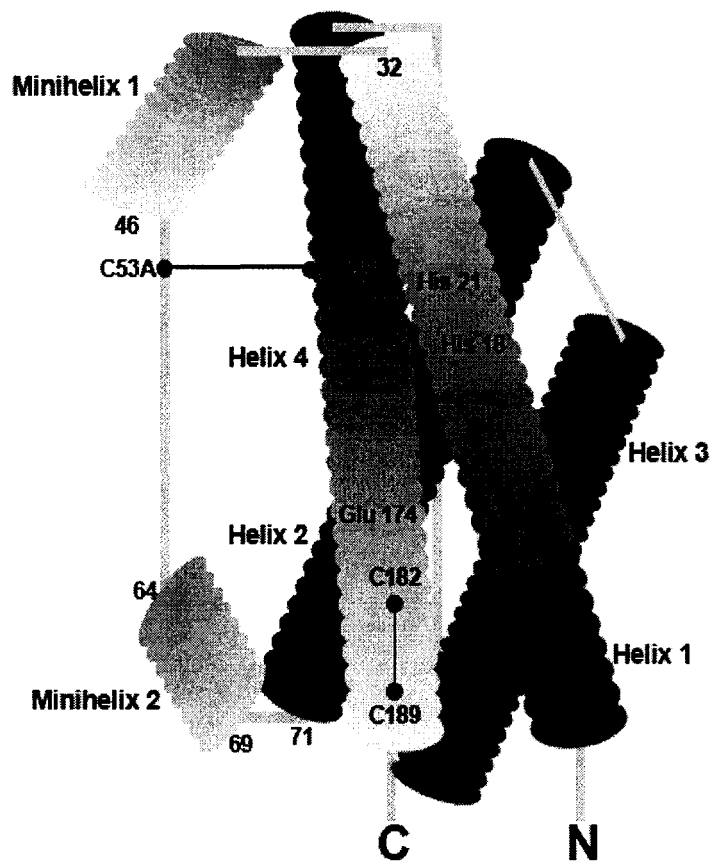


Figure 1.2 Structure schématique de l'hormone de croissance. Les deux ponts di sulfure sont mis en évidence entre les cystéines C53A-C165A et C182A-C189A (Iliev, 2005).

1.3.2 Régulation neuroendocrinienne de la sécrétion de la GH

Le principal contrôle de la GH se fait grâce à deux facteurs neurosécrétés dans l'hypothalamus : la somatostatine qui est une hormone d'inhibition de l'hormone de croissance (GHIH) et l'hormone de relâchement facteur de la GH (GHRH) qui est un stimulateur de la sécrétion de GH (Arimura and Culler, 1985; Prosser, 1991; Peng and Peter, 1997; Perez-Sanchez, 2000). Outre ces facteurs hypothalamiques, il existe des contrôles hormonaux, neuronaux et nutritionnels (Duan and Plisetskaya, 1993).

1.3.3 Régulation de la transcription

La régulation de la transcription d'une protéine est faite à la base par des mécanismes moléculaires, tels que les protéines de liaison et les facteurs de transcription

(Argenton et al., 1996; Farchi-Pisanty et al., 1997). À titre d'exemple, pour le saumon atlantique, le facteur de transcription Pit-1 ainsi que les protéines de liaison associées à ce facteur ont fait l'objet d'investigation pour le GH (Argenton et al., 1996; Farchi-Pisanty et al., 1997). De plus, la transcription chez les vertébrés peut être régulée au niveau de l'ADN par la région régulatrice en amont de celle codant pour le premier exon. Cette région est composée du promoteur qui est la région proximale de l'exon 1 ainsi que de la séquence en amont du promoteur (Yamamoto, 1989). Il a été démontré que seulement quelques mutations au niveau des séquences régulatrices sont suffisantes pour influencer l'expression d'un gène (Schulte et al., 2000). De tels changements dans la régulation d'un gène peuvent avoir un rôle important dans l'évolution adaptative particulièrement lors de l'adaptation à un nouvel environnement (Schulte, 2001).

1.3.4 Effets de la GH

Au niveau cellulaire, l'effet le plus important dans les cellules répondant à la GH (ayant des récepteurs à GH) est une augmentation du transport d'acides aminés. Ce phénomène est coordonné avec la destruction accrue des acides aminés extracellulaires (par la néoglucogenèse) induisant une augmentation de la synthèse protéique (Prosser, 1991).

D'autres études plus spécifiques aux téléostéens qualifient le rôle de la GH comme étant principalement celui de médiateur du facteur de croissance analogue à l'insuline-I (IGF-I) (Wendelaar Bonga, 1993). Selon Sakamoto et al. (1993), la production d'IGF-I a été démontrée dans le foie majoritairement, mais aussi dans les branchies et les reins chez les téléostéens. Outre son rôle évident dans la croissance, il a été démontré que la GH jouait un rôle important dans l'osmorégulation en augmentant chez les poissons anadromes (Sakamoto et al., 1993). Les périodes précédentes, durant et suivant la période de reproduction, sont également des temps où des hauts niveaux de GH plasmatique peuvent être observés chez les téléostéens (Legac et al., 1993).

1.3.5 Niveau de GH chez les poissons

Chez les poissons, il arrive souvent que le taux de croissance soit lié au niveau de la GH plasmatique, soit au printemps (Duan et al., 1995), chez les transgéniques surexprimant la GH (Martinez et al., 1996) ou suite à des injections péritonéales (Marchant et al., 1989a). Par contre, d'autres exemples affirment qu'aucune différence n'est observable entre les niveaux plasmatiques de GH de deux lignées de saumon coho ayant de fortes différences de croissance (Valente et al., 2003). Seul un « test métabolique » réduisant ou arrêtant l'apport en nourriture permettrait de constater une hausse des niveaux de GH dans le plasma chez les individus à croissance rapide (Valente et al., 2003).

La quantité de GH sanguine peut également fluctuer selon la période d'année et la condition nutritionnelle. Une étude sur le poisson rouge (*Cyprinus auratus*) a révélé qu'en période de fraie, au printemps juste avant la copulation, le niveau de GH dans le sérum est au maximum, alors qu'il est au minimum en automne lorsqu'ils sont en dormance sexuelle (Marchant and Peter, 1986; Marchant et al., 1989b). Par ailleurs, il semblerait que la privation de nourriture chez les juvéniles fait augmenter le taux de GH sanguin. Ceci entraîne, à moyen terme, une influence sur l'agressivité de ces individus ce qui leur confère des différences quant à leur chance de se nourrir dans un milieu limitant (Johnsson et al., 1996; Jonsson et al., 1998).

1.3.6 Récepteurs de GH

Les récepteurs à GH (GHR) sont des récepteurs possédant un seul domaine transmembranaire, un domaine N-terminal extracellulaire où la GH se lie et un domaine C-terminal intracellulaire (Fuh et al., 1990). De plus, ils appartiennent à la superfamille des récepteurs cytokine de classe 1 (Calduch-Giner et al., 2001). Le tissu principalement ciblé par la GH (i.e. contenant le plus de GHR) est le foie (Calduch-Giner et al., 2001). Cependant, plusieurs autres tissus possèdent des GHR chez les vertébrés et particulièrement chez les poissons tels que les testicules, les muscles, les branchies, les tissus adipeux, la rate, le système nerveux central et les cellules hématopoïétiques (Moutoussamy et al., 1998; Calduch-Giner et al., 2001).

Les GHR ont été séquencés pour plusieurs espèces de vertébrés, particulièrement les mammifères (Argetsinger and CarterSu, 1996; Tse et al., 2003). Des études précédentes ont démontré qu'il existait entre les GHR des mammifères et ceux des poissons d'importantes similitudes quant à l'architecture de la protéine ainsi que sa fonction et ce, malgré le fait qu'ils n'ont qu'une faible homologie au niveau de la séquence d'acides aminés (a.a.) (Lee et al., 2001). Les téléostéens sont d'ailleurs le groupe taxonomique présentant le plus de variations dans l'homologie des séquences d'a.a. parmi tous les vertébrés, ce qui s'explique par l'écart d'environ 400 millions d'années séparant l'apparition des deux groupes taxonomiques (Tse et al., 2003). Cependant, les GHR provenant de poissons osseux séquencés jusqu'à maintenant confirment que l'homologie des séquences d'a.a. reste significative et ce, principalement au niveau des sites d'actions de ceux-ci avec les membranes des tissus de même qu'avec la molécule de GH en tant que tel (Calduch-Giner et al., 2001). En effet, deux sites appelés boîte 1 et 2 représentant des séquences conservées ont été repérés (Calduch-Giner et al., 2001; Lee et al., 2001; Tse et al., 2003). Aussi, six cystéines ayant un important rôle dans la conformation tertiaire de la protéine et dans ses liaisons avec la GH présentent des positionnements conservés dans les vertébrés (Tse et al., 2003).

Actuellement, les séquences d'a.a. de GHR de seulement cinq espèces de poissons ont été séquencées i.e. le poisson rouge, le turbot, le saumon masou, le saumon coho et la dorade grise (Tse et al., 2003). Ces séquences ont été comparées et ont révélé une homologie des acides aminés de l'ordre de 45% dans le pire des cas (saumon masou vs dorade grise), reflétant une assez bonne conservation dans l'évolution (Tse et al., 2003). À plusieurs occasions, les comparaisons des similitudes entre ces séquences d'a.a. ont révélé que les salmonidés semblaient se détacher des autres téléostéens, tout en gardant une grande homologie entre elles (Tse et al., 2003). À titre d'exemple, les deux ponts di sulfure dans la séquence de la GHR se forment sur les a.a. cystéines qui sont au nombre de quatre chez les salmonidés au lieu de six chez le reste des poissons osseux (Tse et al., 2003).

Des mutations au niveau du gène de GHR chez plusieurs vertébrés ont été reconnues pour cause d'une des formes de nanisme existant (du type Laron) caractérisée par une petite taille à l'âge adulte (Godowski et al., 1989; Huang et al., 1993). Ces mutations engendrent un GHR inactivé ou tronqué causant ainsi une réduction ou un empêchement de liaison par la GH (Amselem et al., 1996). Cette mutation chez la poule (Hull et al., 1999) est le résultat d'une substitution d'une sérine pour une phénylalanine dans la région du domaine extracellulaire du récepteur. Ces formes de nanismes s'appellent également des résistances à la GH puisque lorsque ces mutations sont présentes, la concentration de GH plasmatique n'a pas d'influence sur la quantité capable d'agir sur les tissus cibles (Oconnor et al., 1993). Aussi, une importante diminution de la production de GHR a été remarquée chez les individus résistant à la GH (Duan et al., 1995). Il n'est donc pas anormal de retrouver de haut niveau de GH sanguin sans toutefois remarquer de différence sur la croissance (Duan et al., 1995).

1.4 Le métabolisme du glucose

Le niveau de glucose plasmatique est probablement une des mesures les plus souvent utilisées afin de quantifier les effets d'hormones reliés à la croissance (Alvarellos et al., 2005) et à la digestion (Navarro et al., 1993), à la qualité de la nutrition (Farbridge and Leatherland, 1992b; Mazur et al., 1992; Hung and Storebakken, 1994) ou encore à un stress quel qu'il soit (Pottinger and Carrick, 1999). Ces effets sont relativement bien documentés chez les mammifères et ils commencent à l'être considérablement chez les poissons.

Le glucose est une molécule essentielle pour à peu près toutes formes de vie puisqu'il agit comme combustible au niveau des mitochondries. Ces dernières sont des organites retrouvées à l'intérieur de toutes les cellules vivantes où se produisent plusieurs réactions essentielles responsables de la production de l'énergie nécessaire à la vie telle que le cycle de Krebs. La glycolyse qui consiste à transformer le glucose en deux molécules d'acide pyruvique se produit dans le cytoplasme des cellules (Fig. 1.3). Les molécules associées à l'énergie sont les NADH et NADPH, qui subissent une phosphorylation liée à l'oxydation, ainsi que les ATP et les GTP, qui sont phosphorylés

au niveau du substrat (Horton et al., 1994). L'équivalent de 38 ATP sont formées pour chaque molécule de glucose phosphorylée en condition aérobie.

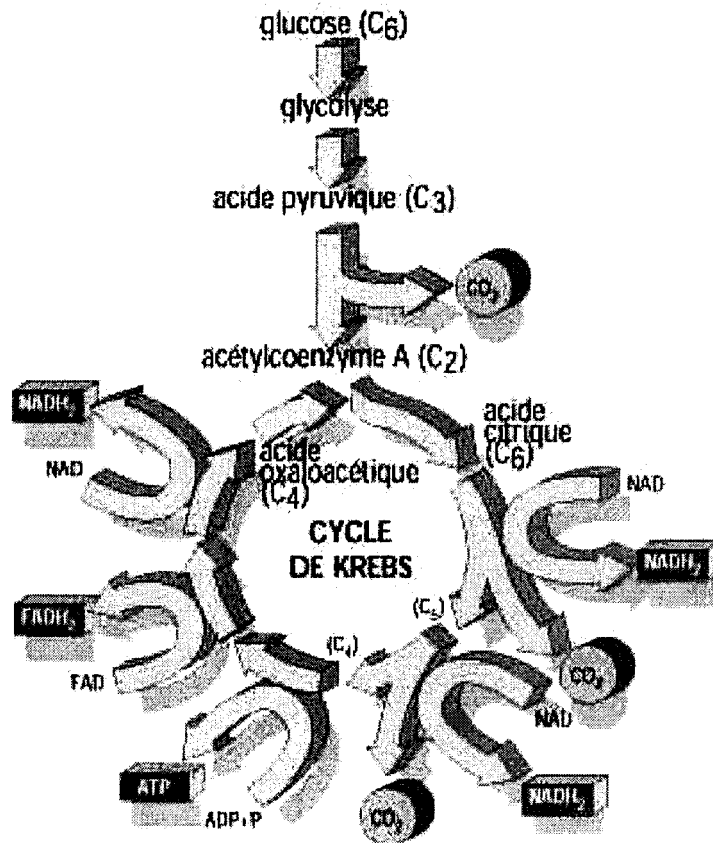


Figure 1.3 Schéma de la biochimie du glucose avec la glycolyse et le cycle de Krebs
(source : <http://perso.wanadoo.fr/alphonse.nass/cycledekrebs.htm>).

Le glucose peut être d'origine exogène comme celui retiré directement des aliments ingérés, principalement sous ses formes disaccharides tels que le saccharose (un glucose et un fructose liés) et le lactose (un glucose et un galactose liés). Dans ces situations, la première étape se veut une séparation des molécules en monosaccharides, pour ensuite, dans le cas du galactose, le transformer en glucose-6-phosphate ce qui coûte un ATP (Horton et al., 1994). Comme autre source de glucose, il existe la production par la gluconéogenèse. Ce processus consiste à fabriquer *de novo* des molécules de glucose à partir de précurseurs non glucidiques tels que le lactate, l'alanine ou encore le glycérol à l'aide de plusieurs enzymes réagissant l'une après l'autre (Horton

et al., 1994). Cependant, selon les mêmes auteurs, la principale source de glucose chez les vertébrés est la glycogénolyse qui consiste à dégrader le glycogène contenu dans les muscles et le foie et de le transformer au besoin en glucose pour enfin le libérer dans le sang.

La glycémie i.e. le niveau de glucose sanguin est un des mécanismes où les bases hormonales régulatrices sont très documentées. Deux hormones issues des îlots de Langerhans ont des rôles bien définis dans le contrôle glycémique : l'insuline et le glucagon. Ces deux hormones polypeptidiques sécrétées respectivement par les cellules bêta et alpha des îlots ont des rôles diamétralement opposés. L'insuline a une fonction régulatrice du taux de glucose sanguin en le réduisant au besoin. Ses modes d'actions physiologiques consistent à accélérer le transport du glucose aux cellules qui le transforment en glycogène (glycogénèse), à augmenter l'absorption des acides aminés ainsi que la synthèse protéique, à activer la conversion du glucose et d'autres nutriments en acides gras, à diminuer la glycogénolyse et à ralentir la néoglucogénèse. Le glucagon, contrairement à l'insuline, sert à contrôler à la hausse le taux de glucose plasmatique. La cible principale du glucagon est le foie qui emmagasine beaucoup de glycogène. Le mode d'action du glucagon consiste à accélérer la conversion du glycogène en glucose (glycogénolyse), à favoriser la formation du glucose à partir de lactate et de certains acides aminés (néoglucogénèse) pour ainsi augmenter le taux de glucose sanguin. Bien que plusieurs autres hormones semblent fluctuer avec ou à l'opposer du niveau de glucose sanguin, les interactions entre ces éléments sont encore faiblement documentées, surtout lorsqu'on considère l'infra classe des téléostéens.

Comme chez les mammifères, les téléostéens voient leur niveau de glucose sanguin fluctuer en fonction de la qualité et quantité de nourriture ingérée ainsi que de la durée après le repas. Par exemple, chez le saumon chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), le taux le plus élevé de glucose survient environ 20 heures après le repas (Mazur et al., 1992) alors que pour le bar rayé (*Morone saxatilis*) ce niveau survient seulement après 20 minutes (Papatriphon et al., 2001). Cependant, selon les auteurs, cette élévation du glucose serait probablement plus attribuable au stress de manipulation,

puisque l'action de l'insuline, habituellement reliée à l'absorption de nourriture, tarde à réagir (Papadryphon et al., 2001). Une étude sur la truite arc-en-ciel (*O. mykiss*) tend à démontrer une constance dans les niveaux de glucose sanguin et ce, peu importe le temps depuis le dernier repas (quelques heures jusqu'à neuf jours) et peu importe l'âge des spécimens (18 et 42 mois) (Sundby et al., 1991). Dans cette situation, seuls les niveaux d'insuline et de glucagon varient de manière à stabiliser le glucose plasmatique.

Malgré le fait que la réponse d'une élévation de la GH sanguine ait entre autres la conséquence d'abaisser le niveau de glucose sanguin comme chez les mammifères et chez la truite arc-en-ciel, la réponse peut prendre plusieurs heures avant de se produire (Farbridge and Leatherland, 1992a). Il en va de même pour la réaction opposée consistant en la diminution de la concentration de GH sanguine lors de l'ingestion de nourriture i.e. l'augmentation de taux de glucose sanguin (Farbridge and Leatherland, 1992a). Bien que son rôle exact dans la croissance demeure vague, la corrélation significative inverse entre le glucose et l'hormone de croissance dans le plasma (Boujard and Leatherland, 1992; Farbridge and Leatherland, 1992a) laisse tout de même présager une importance du glucose pour la croissance.

CHAPITRE II

RÉSUMÉ SUBSTANTIEL DE L'ARTICLE

2.1 Introduction

Le polymorphisme trophique se définit comme étant l'occurrence de formes intra spécifiques distinctes vivant en sympatrie et montrant des différences au niveau des comportements nutritionnels et surtout de l'utilisation de l'habitat (Skulason and Smith, 1995; Smith and Skulason, 1996). Ces formes apparaissent suite à la ségrégation d'une population en au moins deux populations, induisant ainsi des différences au niveau de la morphologie, du comportement et/ou du cycle vital (Skulason and Smith, 1995; Smith and Skulason, 1996). L'association des formes à, soit l'habitat benthique ou à l'habitat limnétique, est la plus répandue chez les poissons (Skulason and Smith, 1995). D'un point de vue écologique, le polymorphisme trophique pourrait jouer un rôle important dans la divergence des populations ainsi que dans les étapes initiales de la spéciation (Westeberhard, 1989; Bush, 1994; Skulason and Smith, 1995). L'apparition des différences phénotypiques est sous contrôle génétique et environnemental. L'apport relatif de ces influences demeure complexe à quantifier et leur élucidation pourrait se révéler d'une importance cruciale pour la compréhension des étapes initiales de la spéciation. Jusqu'à maintenant, peu d'études chez les poissons ont eu pour objet l'investigation des facteurs physiologiques spécifiques pouvant être responsables de la promotion et du maintien du polymorphisme trophique.

Le grand corégone (*Coregonus clupeaformis* Mitchill), se retrouvant largement distribué en Amérique du Nord (Scott and Crossman, 1974), présente, dans certains lacs, un polymorphisme flagrant au niveau de la taille entre les formes. Habituellement, une évidente distribution bimodale basée sur la longueur est observable pour les poissons sexuellement matures. La population présentant des tailles réduites (120-200 mm) est appelée l'écotype nain tandis que l'écotype dit normal est composé d'individus de tailles beaucoup plus importantes (350-550 mm) (Scott and Crossman, 1974; Bernatchez and Dodson, 1991; Bernatchez et al., 1996; Doyon et al., 1998). L'association phénotype-environnement entre la taille et la diète a montré que l'écotype nain est associé à des proies limnétiques zooplanctoniques de petites tailles alors que les normaux se nourrissent de proies benthiques ayant des tailles importantes (Bodaly, 1979; Bernatchez et al., 1999).

Parallèlement aux différences de taille, des différences majeures entre les écotypes ont également été observées pour ce qui est de l'âge à maturité et les taux de croissance (Fortin and Gendron, 1990; Bodaly et al., 1991; Bernatchez et al., 1996; Doyon et al., 1998). Les nains atteignent la maturité sexuelle à un âge moins avancé (entre 1 et 2 ans) tandis que la forme normale devient mature vers 4 à 5 ans (Scott and Crossman, 1974; Fortin and Gendron, 1990; Chouinard et al., 1996; Doyon et al., 1998). Il est intéressant de constater que les taux de croissance chez les écotypes du grand corégone varient en fonction du stade de développement. En effet, au cours de la première année, les nains ont un taux de croissance plus élevé que celui des normaux (Berthelot, 2004) alors qu'à maturité, l'inverse est observé (Fortin and Gendron, 1990). Les grandes différences de taille suggèrent fortement que les bases physiologiques régulant la croissance devraient différer entre les deux écotypes de *C. clupeaformis*.

Parmi les éléments déterminants dans la croissance des vertébrés, l'axe somatotropique, aussi appelé l'axe GH-IGF-I, a un rôle déterminant (Perez-Sanchez and Le Bail, 1999; Pierce et al., 2001). L'hormone de croissance (GH) a une importance particulière au sein de ce mécanisme régulateur de la croissance (Pierce et al., 2001) en stimulant la sécrétion de l'IGF-I (facteur de croissance analogue à l'insuline-I) par le foie (Peng and Peter, 1997; Wendelaar Bonga, 1997). De plus, la GH joue des rôles pouvant aider indirectement la performance de croissance en contrôlant, au moins en partie, le besoin de se nourrir (revu par Peter and Marchant, 1995), l'osmorégulation associée à l'adaptation à un nouveau milieu à teneur différente en électrolytes et la reproduction (Mommensen, 2001; Bjornsson et al., 2002). L'effet de stimulation de la croissance par la GH a été maintes fois documentées chez les poissons (Marchant et al., 1989a; McLean and Donaldson, 1993; Martinez et al., 1996; Rahman and Maclean, 1999).

Sécrétée par la glande pituitaire directement dans la circulation, la GH est sous un contrôle hypothalamique complexe (Bjornsson et al., 2002). Une fois dans la circulation, la GH agit sur les organes cibles en se liant aux récepteurs localisés sur leurs membranes plasmiques des cellules des tissus (Perez-Sanchez and Le Bail, 1999; Lee et al., 2001).

Comme chez tous les vertébrés, le foie possède la plus haute densité de récepteurs à GH (GHR) chez les salmonidés (Sakamoto and Hirano, 1991), et, de ce fait, les tissus hépatiques sont considérés comme la cible principale de la GH (Bjornsson et al., 2002). La liaison de la GH avec ses récepteurs au niveau du foie stimule la sécrétion de l'IGF-I (Duan, 1998) qui influence directement la croissance chez les poissons. De plus, il a été observé que la concentration en GHR d'un tissu (le foie, par exemple) semble influencer la réponse de ce tissu à la GH. Ainsi, un individu dont le foie présente peu de GHR par rapport à un autre va voir sa production d'IGF-I plus faible et donc sa capacité de lier la GH sera réduite (Duan et al., 1995). Bien qu'étudiés à quelques reprises chez les poissons (Lee et al., 2001; Calduch-Giner et al., 2003; Tse et al., 2003), les GHR et leur expression dans le foie n'ont pas fait l'objet d'étude quantitative chez les salmonidés.

Considérant la relation entre la croissance et la complexité de l'axe de la GH-IGF-I, pour les poissons ayant des conditions d'élevage similaires, les meilleures performances de croissance ont été associées à des bas niveaux de GH plasmatique et des hauts niveaux de GHR (Perez-Sanchez and Le Bail, 1999). Chez les poissons, une relation inverse a été remarquée entre la GH et le glucose de poissons nourris de manière à optimiser la croissance (Farbridge and Leatherland, 1992a).

Des retards dans la croissance chez les poissons sont associés avec des hauts niveaux de GH plasmatique et des bas niveaux de GHR (Gray et al., 1992; Duan et al., 1995), comme c'est le cas pour les individus « stunted » saumons coho (Duan et al., 1995). Cette condition nommée « résistance à la GH » est également observée chez les salmonidés privés de nourriture (Wagner and McKeown, 1986; Sumpter et al., 1991). De plus, l'association de haut GH plasmatique et de bas GHR hépatique sont également des symptômes du syndrome de non sensibilité à la GH associés à des formes de nanisme chez les vertébrés (Laron, 1984; Leung et al., 1984).

2.2 Objectifs

Dans cette étude, l'importance de l'hormone de croissance dans la détermination du polymorphisme de taille du grand corégone a été étudiée. Les différences dans les niveaux de GH plasmatique et hépatique de même que la production d'ARNm des GHR ont été investiguées en relation avec les taux de croissance pour des individus appartenant aux écotypes nain et normal. Nous avons étudié des individus 1+ élevés en laboratoire (nains, normaux et leurs hybrides) et d'autres matures provenant du milieu naturel. Les individus de laboratoire permettent de cerner l'influence génétique puisqu'ils sont élevés en conditions similaires alors que ceux provenant du milieu naturel subissent à la fois les influences génétique et environnementale. Les mesures de GH hépatique reflètent la quantité de GH liée aux récepteurs du foie étant donné la relation directe entre ces deux éléments (Peter and Marchant, 1995; Thissen et al., 1999). Les concentrations de glucose ont été déterminées considérant la corrélation inverse pour les salmonidés entre ce métabolite et les niveaux de GH plasmatique (Farbridge and Leatherland, 1992a).

2.3 Matériel et méthodes

2.3.1 Origine des poissons et échantillonnage

2.3.1.1 Individus élevés en laboratoire

Des croisements artificiels ont été effectués afin d'obtenir des nains purs, des normaux purs et des hybrides (voir Lu and Bernatchez, 1998; Rogers et al., 2002). Les individus d'écotype nain du grand corégone ont été capturés au lac Témiscouata (47° 36' N, 68° 45' O) situé à la frontière du Nouveau Brunswick et du Québec (Canada) tandis que les normaux provenaient du lac Aylmer, Maine, (É.U.) (45° 50' N, 71° 26' O). Il a fallu échantillonner chaque forme dans différents lacs puisque pour un lac donné, la période de frai des nains et normaux ne coïncident pas. Ceci a permis de recueillir les produits de reproduction nécessaires afin de générer les lignés. Toutefois, les deux écotypes étaient présents en sympatrie dans chacun de ces lacs. Certains des poissons de la seconde génération (F₂) ont été utilisés pour cette étude alors que d'autres ont servis pour l'étude de Rogers et al. (2001). Tous les groupes de la génération F₂ ont été élevés pendant 20 mois sous les mêmes conditions contrôlées optimisant la croissance des salmonidés (pH=7.5, T=12°C, saturation en oxygène =100% et une photopériode de 12h de noirceur /12h lumière). Les trois groupes ont reçu la même quantité de nourriture pendant toute la période d'élevage.

2.3.1.2 Individus du système naturel

Les individus matures nains et normaux ont été capturés au lac de l'Est (47° 15'N, 69° 30'O) en 2002 à l'aide d'une trappe de type Alaska. L'échantillonnage a eu lieu pendant la période de reproduction du grand corégone i.e. tard en automne (Scott and Crossman, 1974) dans le but de capturer des individus matures. Le succès de pêche en était également accru puisque durant cette période, les poissons se regroupent sur les frayères au lieu d'être dispersés dans le lac.

2.3.1.3 Échantillonnage des tissus

Les poissons élevés en laboratoire ont été échantillonnés à 20 mois afin d'obtenir assez de plasma et de tissu pour les analyses. Les individus provenant du lac de l'Est, bien que leur âge n'a pas été déterminé, étaient tous sexuellement matures. Avant

l'échantillonnage, tous les poissons étaient anesthésiés avec de l'eugénol, pesés, mesurés (longueur totale et largeur) et sexés, lorsque c'était possible. Le foie entier a été prélevé et le sang retiré à l'aide d'une seringue héparinée (1cc ayant une aiguille de 21½ mm de long). La prise de sang se faisait au niveau de la nageoire anale en piquant avec un angle d'environ 45° jusqu'à la veine caudale. Les échantillons de foie étaient conservés à -80 °C afin de préserver l'intégrité moléculaire des tissus jusqu'aux analyses. Il est à noter que pour les poissons provenant du milieu naturel, le foie a été mis immédiatement sur glace sèche. Le sang a été réfrigéré pendant 24 heures. Par la suite, une centrifugation à 3000 g pendant 15 minutes était effectuée. Les surnageants (plasma sanguin) ont été retirés et placés au congélateur (-20 °C) jusqu'aux analyses.

2.3.2 Quantification de l'hormone de croissance (GH)

Le dosage de l'hormone de croissance (GH) a été effectué grâce à la technique d'immunobuvardage semi quantitatif (Western blot). Les échantillons de plasma ont été analysés directement tandis que ceux de foie ont d'abord été homogénéisés dans 5 poids/volume de tampon PBS-T 1X (Phosphate Buffered Saline). Le réactif de Bradford a été utilisé pour quantifier les protéines totales de l'homogénat. Le protocole consiste à faire migrer sur un gel de SDS-Polyacrylamide (10%) une quantité fixe de protéines (40 µg de protéines provenant du foie ou 10 µl de plasma sanguin) à un voltage de 100 V, de transférer le produit de cette migration sur une membrane de nitrocellulose à un ampérage de 20 mA et de bloquer la membrane avec un tampon PBS-T avec 0,05 % de TWEEN et 1% poids/volume de lait déshydraté.

L'hybridation de la GH du corégone se fait à l'aide de deux anticorps qui sont mis en contact avec la membrane pendant une heure à 20°C. Le premier anticorps utilisé est un anticorps GH de la truite/saumon (Groprep, Australie) à une concentration de 1:1000 (anticorps : tampon). Le second anticorps est un anti-lapin (Jackson ImmunoResearch Laboratories, É.U.) utilisé à une concentration de 1:10 000 (anticorps : tampon). Après chacun des deux traitements aux anticorps, des lavages au PBS-T sans lait déshydraté à 20°C ont été effectués. La position et l'intensité de la bande ont été révélées à l'aide du kit « Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus » (Perkin Elmer, Boston) sur

un film de photographie (Kodak Scientific imaging film X-OMAT LS). L'intensité des bandes a été quantifiée en utilisant le système de photo documentation Kodak EDAS 290 comprenant un appareil photo numérique Kodak DC et du logiciel Kodak 1D. Le poids moléculaire et la quantité relative ont été déterminés par comparaison à un standard créé à partir d'une protéine GH de truite/saumon purifiée (Groppe, Australie) dont la concentration était connue.

2.3.3 Quantification du message des récepteurs de GH (ARNm GHR)

La RT-PCR (*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*) a été utilisée pour quantifier l'expression des récepteurs du GH (l'ARNm GHR) dans le foie. L'ARN total a été extrait des foies grâce à la trousse commerciale « RNA/DNA kit » (Qiagen Inc., Allemagne) selon le protocole établi par le fabricant. L'estimation de la quantité d'ARN totale est obtenue par spectrophotométrie (Cary 100) à une absorbance de 260 nm (Varian, É.U.) (Bustin, 2002). L'ARN messager (ARNm) des GHR a été amplifié en utilisant le kit «One Step RT-PCR» (Qiagen Inc., Allemagne). Ceci permet une comparaison semi quantitative entre les groupes (Bustin, 2002). Des amorces spécifiques à l'ARNm des GHR ont été conçues à partir de séquence d'ADNc (ADN complémentaire) de GHR (isoforme 1) du saumon coho (*Oncorhynchus kisutch*) (Numéro d'accès sur Genbank : AF403539). La séquence de l'amorce sens (GHRf) était 5'- TACAACTTGCTKATACRGG -3' alors que l'amorce anti-sens (GHRr) était 5'- GCATAGTCYCTACACCTMTG -3'. Pour le RT-PCR, 1 µg d'ARN total et 2 µl (1.2 µM) de chacune des amorces ont été utilisés. Les autres étapes du RT-PCR ont été effectuées conformément aux recommandations du fournisseur «One Step RT-PCR» (Qiagen Inc). L'ADN complémentaire de GHR a été coloré au bromure d'éthidium et visualisé sous éclairage UV. La détermination semi quantitative des bandes a été réalisée en utilisant le système de photo documentation Kodak EDAS 290. Les bandes d'ADNc des GHR ont été comparées à celles de l'ADNc de la β -actine obtenues pour chacun des individus avec les mêmes conditions de RT-PCR et à l'aide d'amorces spécifiques (sens : 5'-CCAGAAAGACAGCTAC-3' et anti-sens : 5'-CCTTGATGTCTCGTCGATTT-3') (Tse et al. 2003).

2.3.4 Quantification du glucose plasmatique

La concentration de glucose plasmatique a été déterminée par spectrophotométrie à l'aide du « Glucose (HK) Assay Kit » (Sigma). Le « Glucose (HK) Assay Reagent » (le réactif) et le « Glucose Standard Solution » ont été reconstitués et utilisés comme recommandé par le fabricant. Tous les échantillons ont été préparés en duplicata (15 µl) et lus à une absorbance de 340 nm (Cary 100) (Varian, É.U.).

2.3.5 Analyses statistiques

2.3.5.1 Individus élevés en laboratoire

Les taux de croissance ont été déterminés pour les trois groupes élevés en laboratoire en utilisant les poids à 12, 16 et 20 mois. Cent quatre-vingt poissons ont été mesurés pour chaque groupe, c'est-à-dire 60 pour chaque âge (voir Tableau 1.1). Un modèle linéaire général (GLM) a été utilisé pour l'analyse statistique de la pente de la régression du logarithme du poids en fonction du temps. Les différences de pentes étaient considérées comme significatives lorsque $p < 0,05$. Les analyses de taux de croissance ont été effectuées avec SAS 9 (SAS, Heidelberg, Allemagne).

Les quantités de GH plasmatique et hépatique, les niveaux de glucose plasmatique et d'expression GHR (ARNm GHR) ont été comparés entre les groupes (nains, normaux, hybrides) élevés en laboratoire en utilisant des analyses de variance (ANOVA) suivies d'un test de comparaison multiple Tukey HSD. Avant les analyses statistiques, la normalité des distributions et l'effet du poids sur les paramètres de GH ont été vérifiés. Les différences étaient considérées significatives lorsque $p < 0,05$.

2.3.5.2 Individus provenant du milieu naturel

Les différences entre les écotypes pour les mesures de GH plasmatique et hépatique, les niveaux de glucose plasmatique et d'expression GHR (ARNm GHR) ont été vérifiés pour les écotypes du milieu naturel par des tests non paramétriques de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Toutes les comparaisons ont été effectuées à l'aide du logiciel SYSTAT 10 (SPSS, Chicago, É.U.).

2.3.5.3 Facteur de condition

Le facteur de condition (CF) a été calculé pour chacun des groupes de corégones élevés en laboratoire et chacun des écotypes provenant du milieu naturel (Chapitre III Tab 1). Le CF est un indice utilisé pour estimer la santé des poissons et permet d'évaluer si la croissance se fait seulement en longueur ou si le poids suit également la croissance.

2.3.5.4 Nombre d'échantillons (n) pour chaque mesure

Tableau 1.1
Nombre d'échantillons pour chacune des mesures

	Élevage en laboratoire	Milieu naturel
GH plasmatique*	D = 19 H = 15 N = 14	D = 6 N = 5
GH hépatique*	D = 14 H = 14 N = 16	D = 4 N = 4
Glucose plasma*	D = 15 H = 14 N = 16	D = 4 N = 4
ARNm GHR*	D = 10 H = 10 N = 10	D = 4 N = 4
Croissance	D = 180 H = 180 N = 180	Selon littérature

* Analyse en duplicata

2.4 Résultats

2.4.1 Taux de croissance

Le modèle général linéaire (GLM) montre une différence hautement significative ($p < 0,0001$) entre les taux de croissance des groupes élevés en laboratoire. Selon les pentes des régressions, on observe que les normaux ont un taux de croissance plus élevé que les nains et hybrides (Chapitre III Fig. 1). Le poids moyen des nains à 12 mois est plus important par rapport aux normaux et aux hybrides. À 16 mois aucune différence entre les trois groupes n'est visible et à 20 mois les nains et les normaux ont des poids moyens significativement plus importants que les hybrides.

2.4.2 Niveaux de GH plasmatique

Aucune différence significative au niveau des concentrations de GH plasmatique n'a été trouvée entre les trois groupes élevés en laboratoire ni entre les écotypes du système naturel (Chapitre III Fig. 2).

2.4.3 Niveaux de glucose plasmatique

Pour les groupes élevés en laboratoire, le niveau de glucose pour les normaux était significativement plus bas que celui des nains alors que celui des hybrides était intermédiaire (Chapitre III Fig. 3).

2.4.4 Niveaux de GH hépatique

Aucune différence n'a été observée entre les trois groupes élevés en laboratoire en ce qui concerne la GH hépatique (Chapitre III Fig. 4). Par contre, dans le système naturel, les nains ont un niveau de GH hépatique significativement plus bas (20%) que les normaux.

2.4.5 Niveaux d'expression de GHR

La comparaison de l'intensité des bandes entre les groupes a permis une semi-quantification relative de l'ARNm (Chapitre III Fig. 5a). Les intensités de l'ARNm de β -actine pour chacun des individus demeuraient relativement constantes entre ces derniers indiquant qu'il s'agissait d'un bon standard interne. Tandis qu'aucune différence n'a pu

être démontrée entre les trois groupes élevés en laboratoire pour l'ARNm des GHR, les écotypes du système naturel présentaient des différences de l'ordre de 50 % de moins pour les nains (Chapitre III Fig. 5b).

2.4.6 Facteur de condition

Tous les groupes d'individus élevés en laboratoire présentent des CF moyens se rapprochant de 1 ce qui démontre une bonne santé des groupes (Chapitre III Tab. 1). La même chose est observée pour les individus de l'écotype normal provenant du milieu naturel. Cependant, le CF moyen des nains provenant du milieu naturel est plus bas ($0,679 \pm 0,008$) que ceux des normaux ($0,894 \pm 0,011$).

Le bas CF observé chez les individus nains est probablement attribuable au temps d'échantillonnage dans le Lac de l'Est, leur période de frai étant terminée. En effet, durant la période de frai, les males et les femelles se vident de leurs produits de reproduction respectifs ce qui aurait pour effet d'influencer considérablement le CF puisque leurs poids diminuent tandis que leurs longueurs demeurent inchangées.

2.5 Discussion

2.5.1 Taux de croissance

Dans une étude précédente utilisant les mêmes groupes élevés en laboratoire, il a été établi que les nains avaient le taux de croissance le plus important comparativement aux normaux pendant la première année (0+) (Berthelot, 2004). L'étude actuelle montre qu'à partir de 12 mois, le patron relatif entre les formes est le contraire, c'est-à-dire un taux de croissance plus important chez les normaux par rapport aux nains au cours de la seconde année de croissance (1+). En effet ce patron est le même que celui observé pour des individus sexuellement matures (Fortin and Gendron, 1990). Considérant que les individus de l'écotype nain deviennent matures autour de deux ans (Fortin and Gendron, 1990), il n'est pas surprenant d'observer une baisse de taux de croissance entre les nains 0+ et 1+ car ces derniers orientent leur énergie sur la reproduction (Ali et al., 2003). Une diminution plus rapide du taux de croissance pour la forme naine après 12 mois est probablement due à un réinvestissement de l'énergie dans la production de gamètes. Parce que les normaux deviennent matures seulement après 4-5 ans (Fortin and Gendron, 1990), il est plausible que même si le taux de croissance va continuer à décroître, il va toutefois demeurer plus important que celui des nains comme il est rapporté dans la littérature.

À 20 mois, il est surprenant de constater que les tailles des hybrides sont inférieures et non intermédiaires par rapport au deux écotypes usuels (Chapitre III Fig. 1). En effet, parce que l'apport génétique des nains et des normaux est, en principe, équivalent chez les hybrides, on aurait supposé une croissance intermédiaire. Cependant, le fait qu'ils ont les poids les moins importants (Chapitre III Fig. 1 Tableau 1) suggère que les hybrides ne prennent les caractéristiques d'aucun des deux parents laissant croire à un fitness réduit par rapport aux formes pures. Les hybrides en nature seraient plus généralistes que les écotypes purs et seraient ainsi incapables d'être compétitifs au niveau de l'habitat par rapport aux deux autres formes spécialisées dans la zone limnétique pour les nains et benthique pour les normaux (Bernatchez et al., 1999).

2.4.2 Régulation de la croissance par l'axe GH-IGF-I

Les absences de différences significatives dans les niveaux de GH entre les groupes de grands corégones élevés en laboratoire et les matures provenant d'un milieu naturel étaient très surprenantes considérant l'importance de la GH comme régulateur de croissance (Bjornsson et al., 2002) et les taux de croissance obtenus (voir ci-haut). La stimulation de la croissance par des injections de GH exogène (Le Bail et al., 1993; McLean et al., 1997) ou lors de l'induction naturelle de la GH au printemps (Duan et al., 1995) a été démontrée pour les salmonidés.

Cependant, d'autres études montrent l'absence de relations entre la GH plasmatique et les taux de croissance (Niu, 1990; Gomez et al., 1996; Valente et al., 2003). L'absence de différences semblent venir du fait que les truites à croissance rapide ont des niveaux de GH variant de manière épisodique et asynchrone (Gomez et al., 1996), ce qui pourrait aider à expliquer, au moins partiellement, la difficulté d'établir une relation entre la croissance et les niveaux de GH plasmatiques entre les groupes de *C. clupeaformis*. Le statut reproductif peut aussi être considéré comme une influence possible étant donné que la GH tend à augmenter pendant la maturation sexuelle des mâles et femelles saumons Atlantique (Bjornsson et al., 1994). Considérant que dans la présente étude les individus capturés en nature étaient en période de frai, il est possible que les hauts niveaux de GH fussent attribuables à la maturation des gonades.

Aucune relation cohérente n'a pu être observée entre la GH plasmatique et le glucose ni pour les individus élevés en laboratoire ni pour ceux provenant du milieu naturel. En effet, des bas niveaux de GH accompagnés de hauts niveaux de glucose avaient été rapportés pour des truites arc-en-ciel nourries afin d'obtenir une croissance optimale (Farbridge and Leatherland, 1992a). Au contraire, notre étude montre des concentrations en glucose plus faibles pour les normaux élevés en laboratoire ayant le taux de croissance le plus important. Aucune explication n'a pu être fournie à ce propos. Une intéressante tendance montre une plus importante concentration en glucose dans le sang pour les normaux matures provenant du milieu naturel (Chapitre III Fig. 3). L'absence de différences significatives entre les écotypes de corégone dans le milieu

naturel pourrait provenir de la hausse du glucose plasmatique étant plus importante lors de la reproduction (Kubokawa et al., 1999; Svoboda et al., 2001).

L'absence de différences significatives entre les groupes de corégones élevés en laboratoire pour les niveaux de GH hépatique et d'expression du gène GHR pourrait s'expliquer par la réduction de l'influence environnementale (Chapitre III Fig. 4 et 5). En effet, les corégones élevés en laboratoire subissaient les mêmes conditions d'élevage et, seules, des différences génétiques pouvaient départager les trois groupes. Aussi, il semblerait que l'influence environnementale sur les niveaux de GH hépatique et d'expression du gène GHR est importante pour les nain et normaux du milieu naturels associés aux habitats pélagiques et littorales respectivement. Par contre, plusieurs paramètres autres, tels que la taille, l'âge et l'étape dans le cycle de vie diffèrent grandement entre les deux écotypes. Cependant, il est intéressant de constater que dans le milieu naturel, les écotypes présentent des niveaux de GH hépatique et d'expression du gène GHR plus bas pour les nains par rapport au normaux (Chapitre III Fig.4 et 5). On retrouve le même patron chez les individus à croissance retardée du saumon coho où les niveaux de GH liés au foie (GH hépatique) sont bas (Fryer and Bern, 1979; Gray et al., 1992). La situation combinant des bas niveaux de GHR avec des hauts niveaux de GH plasmatique est nommée résistance à la GH (Duan et al., 1995). Chez les vertébrés supérieurs, cette insensibilité à la GH est associée à des formes de nanisme : nanisme de type Laron chez l'humain (Laron, 1984) et celui relié au sexe chez le poulet (Leung et al., 1984; Hull et al., 1999). Même si des niveaux particulièrement hauts de GH plasmatique n'ont pas été observés, les bas niveaux de GH hépatique et d'expression du gène GHR sont cohérents avec le mécanisme régulateur de la croissance qu'on retrouve chez des types de nanismes.

Une autre caractéristique associée à l'insensibilité à la GH est une efficacité réduite d'assimilation des nutriments, ce qui accentue l'inhibition de la croissance (Clemmons and Underwood, 1991). D'ailleurs, il est intéressant de constater qu'il a été démontré que l'écotype nain est 2 à 3 fois moins efficace pour la conversion de la nourriture en énergie (Trudel et al., 2001) ce qui renforce l'hypothèse de la résistance à la GH chez les

corégones nains. Le récent changement dans les patrons de croissance pourrait expliquer l'absence de différence pour les niveaux de GH et d'expression du gène GHR. Une période de temps plus importante pourrait être requise pour mettre en évidence les différences d'expressions entre les nains et les normaux élevés en laboratoire.

La considération de l'insensibilité à la GH comme un important mécanisme régulant la croissance et maintenant le polymorphisme de l'écotype nain du grand corégon n'est encore qu'hypothétique et demande des confirmations. Cependant, des considérations évolutives peuvent être intéressantes à aborder. La contrainte écologique qui aurait pu mener à l'insensibilité à la GH pour l'écotype nain pourrait provenir du contenu en lipides de leur alimentation. En effet, considérant que la GH augmente la lipolyse tout en diminuant la lipogenèse (Perez-Sanchez and Le Bail, 1999; Mommsen, 2001) et surtout que les proies limnétiques contiennent de hauts niveaux de lipides (Kainz et al., 2004), les hauts niveaux de GH auraient pu évoluer afin de mieux répondre aux besoins énergétiques des nains leur permettant d'utiliser plus efficacement les lipides de leur proies zooplanctoniques. La régulation à la baisse des GHR accompagnée d'une efficacité réduite de la capacité de conversion de nourriture pourrait constituer une limitation à la croissance dans les habitats limnétiques.

2.5 Conclusion et perspectives futures

Cette étude met en évidence le rôle de la GH dans le polymorphisme trophique se retrouvant entre les formes naine et normale du grand corégone. Étant donné la complexité de la régulation de l'axe GH-IGF-I, il serait davantage intéressant de mesurer plus de paramètres chez le corégone afin d'élucider le mécanisme responsable du polymorphisme trophique. Toutefois, nos résultats démontrent une cohérence entre les niveaux hépatiques de la GH et l'expression des GHR. Ce résultat nous amène à présumer qu'il s'agit d'un cas de mécanisme d'insensibilité à la GH retrouvée dans certaines formes de nanisme chez les vertébrés (Laron, 1984; Leung et al., 1984). De plus, le changement dans le patron de croissance entre les écotypes nain et normal 0+ (Berthelot, 2004) et les 1+ (cette étude) a mis en évidence l'âge de transition à 12 mois. Dans les études ultérieures, la croissance présumée linéaire ne tenait pas compte de la poussée de croissance des nains avant 1 an.

Cependant, des questions sur le rôle de la GH dans le polymorphisme trophique du grand corégone restent à être clarifiées. Parce que les types de nanismes impliquant la résistance à la GH présentent fréquemment des mutations au niveau des séquences de GHR, il serait intéressant de vérifier si des différences d'homologie surviennent entre les séquences des GHR des écotypes de corégones. Puisque l'insensibilité à la GH entraîne habituellement la diminution des niveaux d'IGF-I, la mesure de ce paramètre pour les individus du milieu naturel augmenterait nos connaissances à propos des mécanismes régulant le nanisme dans le polymorphisme trophique de *C. clupeaformis*.

BIBLIOGRAPHIE DE LA SECTION FRANCOPHONE

Ali, M., Nicieza, A., Wootton, R.J., 2003. Compensatory growth in fishes: A response to growth depression. *Fish Fish.* 4, 147-190.

Alvarellos, S.S., Miguez, J.M., Soengas, J.L., 2005. Actions of growth hormone on carbohydrate metabolism and osmoregulation of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Gen. Comp. Endocrinol.* 141, 214-225.

Amselem, S., Sobrier, M.L., Dastot, F., Duquesnoy, P., Duriez, B., Goossens, M., 1996. Molecular basis of inherited growth hormone resistance in childhood. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 10, 353-369.

Argenton, F., Ramoz, N., Charlet, N., Bernardini, S., Colombo, L., Bortolussi, M., 1996. Mechanisms of transcriptional activation of the promoter of the rainbow trout prolactin gene by GHF1/Pit1 and glucocorticoid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 57-66.

Argetsinger, L.S., CarterSu, C., 1996. Mechanism of signaling by growth hormone receptor. *Physiol. Rev.* 76, 1089-1107.

Arimura, A., Culler, M.D., 1985. Regulation of growth hormone secretion. In: Imura, H. (Ed.), *The pituitary gland*, vol. Raven press, New York, p. 221-259.

Bernatchez, L., Chouinard, A., Lu, G.Q., 1999. Integrating molecular genetics and ecology in studies of adaptive radiation: Whitefish, Coregonus sp., as a case study. *Biol. J. Linnean Soc.* 68, 173-194.

Bernatchez, L., Dodson, J.J., 1990. Allopatric origin of sympatric populations of lake whitefish (Coregonus clupeaformis) as revealed by mitochondrial-DNA restriction analysis. *Evolution* 44, 1263-1271.

Bernatchez, L., Dodson, J.J., 1991. Phylogeographic structure in mitochondrial DNA of the lake whitefish (Coregonus clupeaformis) and its relation to pleistocene glaciations. *Evolution* 45, 1016-1035.

Bernatchez, L., Dodson, J.J., 1994. Phylogenetic relationships among palearctic and nearctic whitefish (Coregonus sp) populations as revealed by mitochondrial DNA variation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 51, 240-251.

Bernatchez, L., Vuorinen, J.A., Bodaly, R.A., Dodson, J.J., 1996. Genetic evidence for reproductive isolation and multiple origins of sympatric trophic ecotypes of whitefish (Coregonus). *Evolution* 50, 624-635.

Berthelot, H., 2004. Croissance des écotypes (0+) nains, normaux et leurs hybrides chez le grand corégone (Coregonus clupeaformis, Mitchill): Implications dans le

polymorphisme trophique. M. Sc. thesis, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières.

Bjornsson, B.T., Johansson, V., Benedet, S., Einarsdottir, I.E., Hildahl, J., Agustsson, T., Jonsson, E., 2002. Growth hormone endocrinology of salmonids: regulatory mechanisms and mode of action. *Fish Physiol. Biochem.* 27, 227-242.

Bjornsson, B.T., Taranger, G.L., Hansen, T., Stefansson, S.O., Haux, C., 1994. The interrelation between photoperiod, growth hormone, and sexual maturation of adult Atlantic salmon (Salmo salar). *Gen. Comp. Endocrinol.* 93, 70-81.

Bodaly, R.A., 1979. Morphological and ecological divergence within the lake whitefish (Coregonus clupeaformis) species complex in the Yukon Territory. *Fish. Res. Board Can. Bull.* 36, 1214-1222.

Bodaly, R.A., Clayton, J.W., Lindsey, C.C., 1988. Status of the Squanga whitefish, Coregonus sp., in the Yukon Territory, Canada. *Can. Field-Nat.* 102, 114-125.

Bodaly, R.A., Clayton, J.W., Lindsey, C.C., Vuorinen, J., 1992. Evolution of lake whitefish (Coregonus clupeaformis) in North America during the pleistocene - Genetic differentiation between sympatric populations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49, 769-779.

Bodaly, R.A., Vuorinen, J., Macins, V., 1991. Sympatric presence of dwarf and normal forms of the Lake whitefish, Coregonus clupeaformis, in Como Lake, Ontario. *Can. Field-Nat.* 105, 87-90.

Boujard, T., Leatherland, J.F., 1992. Circadian pattern of hepatosomatic index, liver glycogen and lipid content, plasma nonesterified fatty-acid, glucose, T3, T4, growth hormone and cortisol concentrations in Oncorhynchus mykiss held under different photoperiod regimes and fed using demand-feeders. *Fish Physiol. Biochem.* 10, 111-122.

Bourke, P., Magnan, P., Rodriguez, M.A., 1997. Individual variations in habitat use and morphology in brook charr. *J. Fish Biol.* 51, 783-794.

Bush, G.L., 1994. Sympatric speciation in animals - New wine in old bottles. *Trends Ecol. Evol.* 9, 285-288.

Bustin, S.A., 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* 29, 23-39.

Calduch-Giner, J.A., Duval, H., Chesnel, F., Boeuf, G., Perez-Sanchez, J., Boujard, D., 2001. Fish growth hormone receptor: Molecular characterization of two membrane-anchored forms. *Endocrinology* 142, 3269-3273.

Calduch-Giner, J.A., Mingarro, M., de Celis, S.V.R., Boujard, D., Perez-Sanchez, J., 2003. Molecular cloning and characterization of gilthead sea bream, (Sparus aurata)

growth hormone receptor (GHR). Assessment of alternative splicing. *Comp. Biochem. Physiol.* 136 B, 1-13.

Chouinard, A., Pigeon, D., Bernatchez, L., 1996. Lack of specialisation in trophic morphology between genetically differentiated dwarf and normal forms of lake whitefish (Coregonus clupeaformis Mitchill) in Lac de l'Est, Quebec. *Can. J. Zool.* 74, 1989-1998.

Clemmons, D.R., Underwood, L.E., 1991. Nutritional regulation of IGF-I and IGF binding-proteins. *Annu. Rev. Nutr.* 11, 393-412.

Doyon, J.F., Schetagne, R., Verdon, R., 1998. Different mercury bioaccumulation rates between sympatric populations of dwarf and normal lake whitefish (Coregonus clupeaformis) in the La Grande complex watershed, James Bay, Quebec. *Biogeochemistry* 40, 203-216.

Doyon, J.-F., Tremblay, A., Proulx, M., 1996. Régime alimentaire des poissons du complexe La Grande et teneurs en mercure dans leurs proies (1993-94). In: Collectivités., Groupe-Conseil Génivar Inc. à la Vice-présidence Environnement et Collectivités. (Ed.), Hydro-Québec, Montreal, 105 p.

Doyon, J.-F., Bernatchez, L., Gendron, M., Verdon, R., Fortin, R., 1998. Comparaison of normal and dwarf populations of lake whitefish (Coregonus clupeaformis) with reference to hydroelectric reservoirs in northern Quebec. *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.* 50, 97-108.

Duan, C., 1998. Nutritional and developmental regulation of insulin-like growth factors in fish. *J. Nutr.* 128, 306S-314S.

Duan, C., Plisetskaya, E.M., 1993. Nutritional regulation of insulin-like growth factor-I messenger RNA expression in salmon tissues. *J. Endocrinol.* 139, 243-252.

Duan, C., Plisetskaya, E.M., Dickhoff, W.W., 1995. Expression of insulin-like growth factor I in normally and abnormally developing coho salmon (Oncorhynchus kisutch). *Endocrinology* 136, 446-452.

Dynes, J., Magnan, P., Bernatchez, L., Rodriguez, M.A., 1999. Genetic and morphological variation between two forms of lacustrine brook charr. *J. Fish Biol.* 54, 955-972.

Farbridge, K.J., Leatherland, J.F., 1992a. Plasma growth hormone levels in fed and fasted rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) are decreased following handling stress. *Fish Physiol. Biochem.* 10, 67-73.

Farbridge, K.J., Leatherland, J.F., 1992b. Temporal changes in plasma thyroid-hormone, growth hormone and free fatty-acid concentrations, and hepatic 5'-monodeiodinase

activity, lipid and protein content during chronic fasting and refeeding in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Fish Physiol. Biochem. 10, 245-257.

Farchi-Pisanty, O., Sternberg, H., Moav, B., 1997. Transcriptional regulation of fish growth hormone gene. Fish Physiol. Biochem. 17, 237-246.

Ferguson, A., Taggart, J.B., 1991. Genetic differentiation among the sympatric brown trout (Salmo trutta) populations of Lough Melvin, Ireland. Biol. J. Linnean Soc. 43, 221-237.

Foote, C.J., Clayton, J.W., Lindsey, C.C., Bodaly, R.A., 1992. Evolution of Lake whitefish (Coregonus clupeaformis) in North America during the pleistocene - Evidence for a Nahanni glacial refuge race in the northern cordillera region. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 49, 760-768.

Foote, C.J., Wood, C.C., Withler, R.E., 1989. Biochemical genetic comparison of sockeye salmon and kokanee, the anadromous and nonanadromous forms of Oncorhynchus nerka. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 46, 149-158.

Fortin, R., Gendron, M., 1990. Comparative reproduction, growth and morphology of dwarf and normal whitefish Coregonus clupeaformis in the Outardes-2 Reservoir (Quebec). Can. J. Zool. 68, 17-25.

Fryer, J.N., Bern, H.A., 1979. Growth hormone binding in tissues of normal and stunted juvenile coho salmon, Oncorhynchus kisutch. J. Fish Biol. 15, 527-533.

Fuh, G., Mulkerrin, M.G., Bass, S., McFarland, N., Brochier, M., Bourell, J.H., Light, D.R., Wells, J.A., 1990. The human growth hormone receptor. Secretion from Escherichia coli and disulfide bonding pattern of the extracellular binding domain. J. Biol. Chem. 265, 3111-3115.

Godowski, P.J., Leung, D.W., Meacham, L.R., Galgani, J.P., Hellmiss, R., Keret, R., Rotwein, P.S., Parks, J.S., Laron, Z., Wood, W.I., 1989. Characterization of the human growth hormone receptor gene and demonstration of a partial gene deletion in two patients with Laron-type dwarfism. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 86, 8083-8087.

Gomez, J.M., Boujard, T., Fostier, A., Le Bail, P.Y., 1996. Characterization of growth hormone nycthemeral plasma profiles in catheterized rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). J. Exp. Zool. 274, 171-180.

Gorbman, A., 1980. Evolution of the brain-pituitary relationship. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 37, 1680-1686.

Gray, E.S., Kelley, K.M., Law, S., Tsai, R., Young, G., Bern, H.A., 1992. Regulation of hepatic growth hormone receptors in coho salmon (Oncorhynchus kisutch). Gen. Comp. Endocrinol. 88, 243-252.

- Grigorian, A.L., Bustamante, J.J., Hernandez, P., Martinez, A.O., Haro, L.S., 2005. Extraordinarily stable disulfide-linked homodimer of human growth hormone. *Protein Sci.* 14, 902-913.
- Hindar, K., Jonsson, B., 1993. Ecological polymorphism in Arctic charr. *Biol. J. Linnean Soc.* 48, 63-74.
- Hori, M., 1993. Frequency-dependent natural selection in the handedness of scale-eating cichlid fish. *Science* 260, 216-219.
- Horton, H.R., Moran, L.A., Ochs, R.S., Rawn, J.D., Scrimgeour, K.G., 1994. Principes de biochimie. In: De Boeck (Ed.), De Boeck Université, Wesmael S.A., Bruxelles, 717 p.
- Huang, N., Cogburn, L.A., Agarwal, S.K., Marks, H.L., Burnside, J., 1993. Overexpression of a truncated growth hormone receptor in the sex-linked dwarf chicken: Evidence for a splice mutation. *Mol. Endocrinol.* 7, 1391-1398.
- Hull, K.L., Marsh, J.A., Harvey, S., 1999. A missense mutation in the GHR gene of Cornell sex-linked dwarf chickens does not abolish serum GH binding. *J. Endocrinol.* 161, 495-501.
- Hung, S.S.O., Storebakken, T., 1994. Carbohydrate utilization by rainbow trout is affected by feeding strategy. *J. Nutr.* 124, 223-230.
- Johnsson, J.I., Jonsson, E., Bjornsson, B.T., 1996. Dominance, nutritional state, and growth hormone levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Horm. Behav.* 30, 13-21.
- Iliev, D.I., 2005. Structural analysis of human growth hormone with respect to the dominant expression of GH mutations in isolated growth hormone deficiency type II. Doctor thesis, Eberhard-Karls Universität, Tübingen.
- Jonsson, E., Johnsson, J.I., Bjornsson, B.T., 1998. Growth hormone increases aggressive behavior in juvenile rainbow trout. *Horm. Behav.* 33, 9-15.
- Kainz, M., Arts, M.T., Mazumder, A., 2004. Essential fatty acids in the planktonic food web and their ecological role for higher trophic levels. *Limnol. Oceanogr.* 49, 1784-1793.
- Kubokawa, K., Watanabe, T., Yoshioka, M., Iwata, M., 1999. Effects of acute stress on plasma cortisol, sex steroid hormone and glucose levels in male and female sockeye salmon during the breeding season. *Aquaculture* 172, 335-349.
- Laron, Z., 1984. Laron-type dwarfism (hereditary somatomedin deficiency): A review. *Ergeb Inn Med Kinderheilkd* 51, 117-150.

- Le Bail, P.Y., Pérez-Sánchez, J., Yao, J., Maisse, G., 1993. Effect of GH treatment on salmonid growth: study of the variability of response. In: Lahlou, B., Vitiello, P. (Eds.), *Aquaculture: fundamental and applied aspects*, American Geophysical Union, Washington, DC, p. 173-197.
- Lee, L.T.O., Nong, G., Chan, Y.H., Tse, D.L.Y., Cheng, C.H.K., 2001. Molecular cloning of a teleost growth hormone receptor and its functional interaction with human growth hormone. *Gene* 270, 121-129.
- Legac, F., Blaise, O., Fostier, A., Le Bail, P.Y., Loir, M., Mourot, B., Weil, C., 1993. Growth hormone (GH) and reproduction - A review. *Fish Physiol. Biochem.* 11, 219-232.
- Leung, F.C., Taylor, J.E., Steelman, S.L., Bennett, C.D., Rodkey, J.A., Long, R.A., Serio, R., Weppelman, R.M., Olson, G., 1984. Purification and properties of chicken growth hormone and the development of a homologous radioimmunoassay. *Gen. Comp. Endocrinol.* 56, 389-400.
- Lindsey, C.C., 1981. Stocks are chameleons: plasticity in gill rakers of coregonid fishes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38, 1497-1506.
- Lu, G.Q., Bernatchez, L., 1998. Experimental evidence for reduced hybrid viability between dwarf and normal ecotypes of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis* Mitchill). *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.* 265, 1025-1030.
- Marchant, T.A., Chang, J.P., Nahorniak, C.S., Peter, R.E., 1989a. Evidence that gonadotropin-releasing hormone also functions as a growth hormone-releasing factor in the goldfish. *Endocrinology* 124, 2509-2518.
- Marchant, T.A., Dulka, J.G., Peter, R.E., 1989b. Relationship between serum growth hormone levels and the brain and pituitary content of immunoreactive somatostatin in the goldfish, *Carassius auratus* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 73, 458-468.
- Marchant, T.A., Peter, R.E., 1986. Seasonal variations in body growth rates and circulating levels of growth hormone in the goldfish, *Carassius auratus*. *J. Exp. Zool.* 237, 231-239.
- Martinez, R., Estrada, M.P., Berlanga, J., Guillen, I., Hernandez, O., Cabrera, E., Pimentel, R., Morales, R., Herrera, F., Morales, A., Pina, J.C., Abad, Z., Sanchez, V., Melamed, P., Leonart, R., de la Fuente, J., 1996. Growth enhancement in transgenic tilapia by ectopic expression of tilapia growth hormone. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 5, 62-70.
- Mazur, C.N., Higgs, D.A., Plisetskaya, E., March, B.E., 1992. Utilization of dietary starch and glucose tolerance in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) of different strains in seawater. *Fish Physiol. Biochem.* 10, 303-313.

McLean, E., Devlin, R.H., Byatt, J.C., Clarke, W.C., Donaldson, E.M., 1997. Impact of a controlled release formulation of recombinant bovine growth hormone upon growth and seawater adaptation in coho (Oncorhynchus kisutch) and chinook (Oncorhynchus tshawytscha) salmon. *Aquaculture* 156, 113-128.

McLean, E., Donaldson, E.M., 1993. The role of growth hormone in growth of poikilotherms. In: Schriebman, M.P., Scanes, C.G., Pang, P.K.T. (Eds.), *The endocrinology of growth, development and metabolism in vertebrates*, Academic Press, San Diego, p. 43-71.

McVeigh, H.P., Hynes, R.A., Ferguson, A., 1995. Mitochondrial DNA differentiation of sympatric populations of brown trout, Salmo trutta L, from Lough-Melvin, Ireland. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, 1617-1622.

Meyer, A., 1989. Cost of morphological specialization - feeding performance of the two morphs in the trophically polymorphic cichlid fish, Cichlasoma citrinellum. *Oecologia* 80, 431-436.

Meyer, A., 1990. Morphometrics and allometry in the trophically polymorphic cichlid fish, Cichlasoma citrinellum - Alternative adaptations and ontogenic changes in shape. *J. Zool.* 221, 237-260.

Mommsen, T.P., 2001. Paradigms of growth in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 129 B, 207-219.

Moutoussamy, S., Kelly, P.A., Finidori, J., 1998. Growth-hormone-receptor and cytokine-receptor-family signaling. *Eur. J. Biochem.* 255, 1-11.

Navarro, I., Carneiro, M.N., Parrizas, M., Maestro, J.L., Planas, J., Gutierrez, J., 1993. Post-feeding levels of insulin and glucagon in trout (Salmo trutta, Fario). *Comp. Biochem. Physiol.* 104 A, 389-393.

Niall, H.D., Hogan, M.L., Sauger, R., Rosenblum, I.Y., Greenwood, F.C., 1971. Sequence of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: Evolution from a primordial peptides by gene reduplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 68, 866-869.

Niall, H.D., Hogan, M.L., Tregear, G.W., Segre, G.V., Hwang, P., Freisen, H., 1973. The chemistry of growth hormone and lactogenic hormone. *Recent Prog. Horm. Res.* 29, 387-416.

Niu, P.D., 1990. Etude du polymorphisme de l'hormone de croissance (GH) chez la truite arc-en-ciel (Oncorhynchus mykiss). In: Université de Rennes (Ed.), Université de Rennes I, Rennes, 118 p.

Nordeng, H., 1983. Solution to the char problem based on Arctic char (Salvelinus alpinus) in Norway. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40, 1372-1387.

- Oconnor, P.K., Reich, B., Sheridan, M.A., 1993. Growth hormone stimulates hepatic lipid mobilization in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. J. Comp. Physiol. B-Biochem. Syst. Environ. Physiol. 163, 427-431.
- Papatryphon, E., Capilla, E., Navarro, I., Soares, J.H., 2001. Early insulin and glucagon response associated with food intake in a teleost, the striped bass (Morone saxatilis). Fish Physiol. Biochem. 24, 31-39.
- Peng, C., Peter, R.E., 1997. Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion and growth in fish. Zool. Stud. 36, 79-89.
- Perez-Sanchez, J., 2000. The involvement of growth hormone in growth regulation, energy homeostasis and immune function in the gilthead sea bream (Sparus aurata): A short review. Fish Physiol. Biochem. 22, 135-144.
- Perez-Sanchez, J., Le Bail, P.Y., 1999. Growth hormone axis as marker of nutritional status and growth performance in fish. Aquaculture 177, 117-128.
- Perez-Sanchez, J., Weil, C., Le Bail, P.Y., 1992. Effects of human insulin-like growth factor-I on release of growth hormone by rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) pituitary cells. J. Exp. Zool. 262, 287-290.
- Peter, R.E., Marchant, T.A., 1995. The endocrinology of growth in carp and related species. Aquaculture 129, 299-321.
- Pierce, A.L., Beckman, B.R., Schearer, K.D., Larsen, D.A., Dickhoff, W.W., 2001. Effects of ration on somatotrophic hormones and growth in coho salmon. Comp. Biochem. Physiol. 128 B, 255-264.
- Pigeon, D., Chouinard, A., Bernatchez, L., 1997. Multiple modes of speciation involved in the parallel evolution of sympatric morphotypes of lake whitefish (Coregonus clupeaformis, Salmonidae). Evolution 51, 196-205.
- Pottinger, T.G., Carrick, T.R., 1999. A comparison of plasma glucose and plasma cortisol as selection markers for high and low stress-responsiveness in female rainbow trout. Aquaculture 175, 351-363.
- Prosser, C.L. Neural and Integrative Animal Physiology, John Wiley and Sons, Inc., New York 1991, 776 p.
- Rahman, M.A., Maclean, N., 1999. Growth performance of transgenic tilapia containing an exogenous piscine growth hormone gene. Aquaculture 173, 333-346.
- Robinson, B.W., Wilson, D.S., 1994. Character release and displacement in fishes - A neglected literature. Am. Nat. 144, 596-627.

Robinson, B.W., Wilson, D.S., Margosian, A.S., Lotito, P.T., 1993. Ecological and morphological differentiation of pumpkinseed sunfish in lakes without bluegill sunfish. *Evol. Ecol.* 7, 451-464.

Rogers, S.M., Campbell, D., Baird, S.J., Danzmann, R.G., Bernatchez, L., 2001. Combining the analyses of introgressive hybridisation and linkage mapping to investigate the genetic architecture of population divergence in the lake whitefish (Coregonus clupeaformis, Mitchill). *Genetica* 111, 25-41.

Rogers, S.M., Gagnon, V., Bernatchez, L., 2002. Genetically based phenotype-environment association for swimming behavior in lake whitefish ecotypes (Coregonus clupeaformis Mitchill). *Evolution* 56, 2322-2329.

Sakamoto, T., Hirano, T., 1991. Growth hormone receptors in the liver and osmoregulatory organs of rainbow trout - Characterization and dynamics during adaptation to seawater. *J. Endocrinol.* 130, 425-433.

Sakamoto, T., McCormick, S.D., Hirano, T., 1993. Osmoregulatory actions of growth hormone and its mode of action in salmonids - A review. *Fish Physiol. Biochem.* 11, 155-164.

Schluter, D., 1994. Experimental evidence that competition promotes divergence in adaptive radiation. *Science* 266, 798-801.

Schluter, D., 1995. Adaptive radiation in sticklebacks - Trade-offs in feeding performance and growth. *Ecology* 76, 82-90.

Schluter, D., McPhail, J.D., 1993. Character displacement and replicate adaptive radiation. *Trends in Ecol.Evol.* 8, 197-200.

Schulte, P.M., 2001. Environmental adaptations as windows on molecular evolution. *Comp. Biochem. Physiol.* 128 B, 597-611.

Schulte, P.M., Glemet, H.C., Fiebig, A.A., Powers, D.A., 2000. Adaptive variation in lactate dehydrogenase-B gene expression: Role of a stress-responsive regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97, 6597-6602.

Scott, W.B., Crossman, E.J., 1974. *Poissons d'eau douce du Canada*. Office de recherches sur les pêcheries du Canada, Ottawa. Bulletin 184.1026 p.

Seo, H., 1985. Growth hormone and prolactin: Chemistry, gene organization, biosynthesis, and regulation of gene expression. In: Imura, H. (Ed.), *The Pituitary gland*, Raven press, New York, p. 57-82.

Sigurjonsdottir, H., Gunnarsson, K., 1989. Alternative mating tactics of Arctic charr, Salvelinus alpinus, in Thingvallavatn, Iceland. *Environ. Biol. Fishes* 26, 159-176.

- Skulason, S., Smith, T.B., 1995. Resource polymorphisms in vertebrates. *Trends Ecol. Evol.* 10, 366-370.
- Skulason, S., Snorrason, S.S., Noakes, D.L.G., Ferguson, M.M., 1996. Genetic basis of life history variations among sympatric morphs of Arctic char, Salvelinus alpinus. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, 1807-1813.
- Smith, T.B., Skulason, S., 1996. Evolutionary significance of resource polymorphisms in fishes, amphibians, and birds. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 27, 111-133.
- Sumpter, J.P., Le Bail, P.Y., Pickering, A.D., Pottinger, T.G., Carragher, J.F., 1991. The effect of starvation on growth and plasma growth hormone concentrations of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. *Gen. Comp. Endocrinol.* 83, 94-102.
- Sundby, A., Eliassen, K., Refstie, T., Plisetskaya, E.M., 1991. Plasma levels of insulin, glucagon and glucagonlike peptide in salmonids of different weights. *Fish Physiol. Biochem.* 9, 223-230.
- Svärson, G., 1979. Speciation in scandinavian coregonines. In: Institute of fresh-water research (Ed.), vol. 64. Institute of fresh-water research, Drottningholm, p. 1-95
- Svoboda, M., Kouril, J., Hamackova, J., Kalab, P., Savina, L., Svobodova, Z., Vykusova, B., 2001. Biochemical profile of blood plasma of tench (Tinca tinca L.) during pre- and postspawning period. *Acta Vet. Brno* 70, 259-268.
- Taylor, E.B., Bentzen, P., 1993. Evidence for multiple origins and sympatric divergence of trophic ecotypes of smelt (Osmerus) in northeastern North America. *Evolution* 47, 813-832.
- Taylor, E.B., Foote, C.J., Wood, C.C., 1996. Molecular genetic evidence for parallel life-history evolution within a Pacific salmon (sockeye salmon and kokanee, Oncorhynchus nerka). *Evolution* 50, 401-416.
- Thissen, J.P., Underwood, L.E., Ketelslegers, J.M., 1999. Regulation of insulin-like growth factor-I in starvation and injury. *Nutr. Rev.* 57, 167-176.
- Trudel, M., Tremblay, A., Schetagne, R., Rasmussen, J.B., 2001. Why are dwarf fish so small? An energetic analysis of polymorphism in lake whitefish (Coregonus clupeaformis). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 58, 394-405.
- Tse, D.L.Y., Tse, M.C.L., Chan, C.B., Deng, L., Zhang, W.M., Lin, H.R., Cheng, C.H.K., 2003. Seabream growth hormone receptor: molecular cloning and functional studies of the full-length cDNA, and tissue expression of two alternatively spliced forms. *Biochim. Biophys. Acta-Gene Struct. Expression* 1625, 64-76.

- Valente, L.M.P., Le Bail, P.Y., Gomes, E.F.S., Fauconneau, B., 2003. Hormone profile in fast- and slow-growing strains of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) in response to nutritional state. *Aquaculture* 219, 829-839.
- Vuorinen, J., Himberg, K.-J.M., Lankinen, P., 1981. Genetic differentiation of Coregonus albula (L.) (Salmonidae) populations in Finland. *Hereditas* 94, 113-121.
- Wagner, G.F., McKeown, B.A., 1986. Development of a salmon growth hormone radioimmunoassay. *Gen. Comp. Endocrinol.* 62, 452-458.
- Wallis, M., 1975. The molecular evolution of pituitary hormones. *Biol. Rev.* 50, 35-98.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1993. Endocrinology. In: Evans, D.H. (Ed.), *The physiology of fishes*, CRC, Boca Raton, p. 469-475.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591-625.
- Westerberhard, M.J., 1989. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 20, 249-278.
- Wood, C.C., Foote, C.J., 1990. Genetic differences in the early development and growth of sympatric sockeye salmon and kokanee (Oncorhynchus nerka), and their hybrids. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47, 2250-2260.
- Yamamoto, K.R., 1989. A conceptual view of transcriptional regulation. *Am. Zool.* 29, 537-547.

CHAPITRE III

ARTICLE SCIENTIFIQUE

Importance of growth hormone (GH) for trophic polymorphism of lake whitefish
(*Coregonus clupeaformis*): GH regulation in dwarf and normal ecotypes

Sébastien Bigras¹ and Hélène Gl  met^{2*}

¹INRS – Institut Armand-Frappier, 531 Boul. des Prairies, Laval H7V 1B7, Canada

²Université du Québec à Trois-Rivières, Département de chimie-biologie, C.P. 500,
Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7

Sebastien Bigras@iaf.inrs.ca, Helene Glemet@UQTR.ca

* Corresponding author

Role of GH for trophic polymorphism in lake whitefish

Abstract

Few studies have examined the importance of specific physiological factors in promoting and maintaining trophic polymorphism in fish. We investigate a possible role for growth hormone (GH) in determining the body-size polymorphism presented by dwarf and normal lake whitefish. No differences in plasma GH levels among 1+ laboratory raised groups (dwarf, normal and their hybrids) and between sexually mature dwarf and normal ecotypes sampled in the field were observed despite differences in their growth rates. For laboratory-raised fish, we observe that normal individuals have a higher growth rate than dwarf ones during their second year of growth. This pattern is contrary to that observed in a previous study for 0+ individuals but similar to that reported in the literature for mature ecotypes. Low levels of both hepatic GH and GH receptor (GHR) gene expression in mature dwarf ecotypes point to the possibility of GH insensitivity. The absence of such differences among laboratory-raised groups may be related to the recency of the growth rate reversal such that longer time periods may be required to establish GHR level differences. Low levels of hepatic GH in dwarf ecotypes are coherent with the GH insensitivity syndrome of dwarfism in higher vertebrates and a similar growth regulating mechanism may be responsible in promoting the body size associated with trophic polymorphism in lake whitefish.

Key words: Growth hormone, growth rate, lake whitefish, *Coregonus clupeaformis*, growth hormone receptor, trophic polymorphism, GH resistance

Introduction

Trophic polymorphism is widespread and diverse in a number of vertebrates and is characterized by the appearance of forms coexisting in sympatry as a result of segregation in habitat and diet (reviewed by Skúlason and Smith, 1995). In fish, the nature of the major ecological difference is a benthic/ limnetic dichotomy in habitat use (Skúlason and Smith, 1995). While correlated with differential niche use, the fractionation of a single population is likely to create distinct morphologies, behaviours and/or differences in the life history of the newly separated populations (Skúlason and Smith, 1995; Smith and Skúlason, 1996). It has been suggested that this phenomenon is a precursory step to speciation in Vertebrates (Westerberhard, 1989; Smith, 1993; Bush, 1994; Skúlason and Smith, 1995) and particularly in bony fish where abundant examples of trophic polymorphism are known to occur (Meyer, 1987; Foote et al., 1989; Hori, 1993; Schluter and McPhail, 1993; Robinson et al., 1996). It is already recognized that phenotypic characteristics associated with trophic polymorphism are regulated in response to underlying genotype and environmental stimuli. However, the relative roles of these factors have proven difficult to quantify and their elucidation remains a major stumbling block in the field. To date, few studies have investigated specific physiological factors responsible for promoting and maintaining trophic polymorphism in fish.

Lake whitefish (*Coregonus clupeaformis* Mitchill) are widely distributed in North America and in some lakes (Scott and Crossman, 1974) present an obvious body-size polymorphism. Commonly, a strong bimodal size distribution is observed for sexually maturing fish. The population presenting a small body size (120-200 mm) is referred to as “dwarf” as opposed to the “normal” form, which has a much larger body size (350-550 mm) (Scott and Crossman, 1974; Bernatchez and Dodson, 1991). A phenotype-environment association between body size and diet has been documented whereby the dwarf ecotype is associated with a diet of smaller, limnetic zoo-planktonic prey and normal ecotypes feed on larger, epibenthic prey (Bodaly, 1979; Bernatchez et al., 1999). Concomitant with the body-size distinction, major differences are also observed in both the age at maturity and growth rate (Fortin and Gendron, 1990; Bodaly et al., 1991; Bernatchez et al., 1996; Doyon et al., 1998). The dwarf form reaches sexual maturity at

an early age (1 to 2 years-old) while the normal form matures at approximately 4 to 5 years-old (Scott and Crossman, 1974; Fortin and Gendron, 1990; Chouinard et al., 1996; Doyon et al., 1998). Interestingly, growth rate of whitefish ecotypes has been shown to vary according to developmental stage. Dwarf individuals grow faster than their normal counterparts during their first year of life (Berthelot, 2004), this trend being reversed with a higher growth rate for the normal ecotype, when both populations are sexually mature (Fortin and Gendron, 1990). Taken together, these explicit growth differences strongly suggest that the observed body-size polymorphism of *C. clupeaformis* is promoted and maintained by physiological factors regulating growth.

Among the major elements regulating growth in Vertebrates, central is the growth hormone (GH) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) axis (Perez-Sanchez and Le Bail, 1999; Pierce et al., 2001). GH is an essential regulator of somatic growth, but has other important roles in osmoregulatory adaptation and in reproduction which may also supply essential indirect support to growth performance (Mommensen, 2001; Bjornsson et al., 2002). The critical importance of GH for fish growth has been illustrated repeatedly. Growth-promoting effects have been demonstrated by intra-peritoneal injections of both GH (McLean and Donaldson, 1993) and gonadotropin-releasing hormone (Marchant et al., 1989) and from the overexpression of GH by transgenic tilapia (Martinez et al., 1996; Rahman and Maclean, 1999).

GH is synthesized in the pituitary gland and secreted into the circulation under complex hypothalamic control (Bjornsson et al., 2002). Circulating GH interacts directly with specific receptors (growth hormone receptors, GHR) located on the membrane of target tissue cells (Perez-Sanchez and Le Bail, 1999; Lee et al., 2001). In salmonids, the liver has by far the highest density of GHR (Sakamoto and Hirano, 1991), and is considered the major target for GH action (Bjornsson et al., 2002). Binding of GH to liver receptors stimulates the hepatic generation of endocrine IGF-I (Duan, 1998), which in turn directly influences fish growth. GHR gene expression (measured by mRNA) in liver has only so far been studied in goldfish (Lee et al., 2001), black sea bream (Tse et al., 2003) and gilthead sea bream (Calduch-Giner et al., 2003), but not in salmonids. The only

attempt to quantify GHR gene expression in salmonids is in vertebrae bony tissue of Atlantic salmon (Wargelius et al., 2005).

While the relationship between growth and the GH axis is complex, for fish with the same age and in the same condition of photoperiod and temperature, it appears that the best growth performance is achieved with low plasma GH in combination with a high concentration of hepatic GHR (Perez-Sanchez and Le Bail, 1999). An inverse correlation between plasma GH and glucose can also accompany fish that have been fed for optimal growth (Farbridge and Leatherland, 1992). Fish having retarded growth display a contrary pattern in plasma GH/ hepatic GHR. Stunted coho salmon are associated with high plasma GH accompanied by low amounts of hepatic GH receptors (Gray et al., 1992; Duan et al., 1995), a condition characteristic of GH resistance observed for starved salmonids (Wagner and McKeown, 1986; Sumpter et al., 1991). Interestingly, high levels of circulating GH and low hepatic GHR are also reminiscent of the GH insensitivity syndromes found in higher vertebrates, such as Laron-type dwarfism in humans (Laron, 1984) and sex-linked dwarfism in chickens (Leung et al., 1984).

In the present study, the importance of growth hormone in determining body-size polymorphism of lake whitefish was examined. Possible differences in plasma GH and liver GH receptor levels (as well as GHR mRNA expression) in dwarf and normal ecotypes were investigated in relation to their growth rates. We studied 1+ individuals (pure dwarf, pure normal and hybrids) raised under similar laboratory conditions which allowed us to discern genetically-determined effects in the absence of environmental influences, and sexually-mature individuals sampled in the wild subject to both genotype and environmental influences. A measurement of hepatic GH was used as a proxy for GH receptor levels since a direct relationship exist between bound GH and receptor density in liver (Peter and Marchant, 1995; Thissen et al., 1999). Glucose levels were determined given the inverse correlation between this metabolite and GH plasma levels reported for salmonids (Farbridge and Leatherland, 1992).

Material and methods

Fish origin and rearing conditions

Laboratory-raised fish

The F₁ generation consisted of pure dwarf, pure normal and hybrid dwarf/normal crosses (See Lu and Bernatchez, 1998; Rogers et al., 2002). For these studies, dwarf individuals of lake whitefish were caught in Lake Témiscouata (47° 36' N, 68° 45' W), located on the New Brunswick-Québec border (Canada) whereas, normal specimens originated from Lake Aylmer, Maine (USA) (45° 50' N, 71° 26' W). It was necessary to sample different lakes in order to obtain spawning individuals of each ecotype. Their reproductive products were necessary to generate the crosses. Although the normal and dwarf forms were sampled in different lakes, the two ecotypes occur sympatrically in each of these lakes. Individuals used in this study are from the same F₂ generation used by Rogers et al. (2001). All F₂ groups (pure dwarf, pure normal and hybrids) were raised during a 20-month period under identical controlled conditions optimal for salmonid growth (Bodaly et al., 1988) (pH=7.5, T=12°C, oxygen saturation=100% and photoperiod was 12h dark /12h light). The three groups were fed equal amounts of food over the entire growth period, beginning with 72 small meals per day.

Fish captured in the wild

Mature sympatric dwarf and normal individuals of lake whitefish were captured in East Lake (47°15'N, 69°30'W) in 2002 using gill nets and an Alaska trap. Sampling was conducted during the reproductive period of *C. clupeaformis* in late fall (Scott and Crossman, 1974) in order to obtain mature individuals. Sampling during this period also

had the advantage of increasing fishing success since individuals that otherwise are spread out over large areas, tended to regroup on spawning sites.

Tissue sampling

Laboratory-raised fish were sampled at 20 months of age so that enough plasma and tissue could be obtained for analyses. At the time of sampling, individuals from the wild were sexually mature. Prior to sampling, all fish were anaesthetised using eugenol, weighed, measured and sexed when possible. For each fish, blood was drawn from the caudal vessel with a heparinised syringe and whole liver was then removed. Blood samples were put on ice for 24 hours and centrifuged at 3000 G for 15 minutes at 4 °C. The plasma was conserved at -20 °C and the liver was immediately placed on dry ice and stored at -80 °C until analyses. Fifteen individuals for each group (dwarf, normal and hybrid) of the laboratory-raised fish were used in the following analyses except were otherwise noted. Four individuals of each ecotype were sampled from the natural environment.

Quantification of GH

GH levels were determined in plasma and liver by western blot allowing for a relative semi-quantification of GH between fish groups. While plasma samples were used directly, liver samples were first homogenized with 5-fold 1X PBS buffer (0.5 g of hepatic tissue in 2.5 ml of 1X PBS). Bradford reagent (SIGMA) was used to quantify total protein in the liver homogenate. A fixed amount of total protein (40 µg per ml of homogenate liver tissue or 10 µl of plasma) was submitted to electrophoresis (180 V)

using a 10 % SDS-Page and separated proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane (20 mA).

GH was hybridized using two antibodies by two separate treatments lasting 1 hour each. The first antibody was a trout/salmon anti-GH (GroPep, Australia) used at a 1:1,000 (antibody:buffer) concentration ratio and the second one was a rabbit antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA) at a 1:10,000 (antibody:buffer) concentration ratio. After each antibody treatment, the nitrocellulose membrane was washed with PBS-T. The “Western lightning Chemiluminescence Reagent plus” kit (Perkin Elmer, Boston) was used to reveal bands. The position and intensity of bands were revealed on photographic film (Kodak Scientific imaging film X-OMAT LS, USA). Further quantification of GH levels was made using a photodocumentation system (Kodak EDAS 290). GH molecular weight and quantity were finally determined by comparing sample bands with trout/salmon GH (GroPep, Australia), used as a standard.

Glucose quantification

Glucose concentration in plasma was determined spectrophotometrically using the Glucose (HK) assay kit (Sigma). Glucose Standard solution and Glucose (HK) Assay Reagent were reconstituted and used as recommended. Each plasma sample (15 µl) was prepared in duplicate and read twice (absorbance at 340 nm).

GH receptor mRNA

Total RNA was extracted from the livers of both the laboratory-raised group (10 per group) and the fish captured in the wild (4 per ecotype) using the “RNA/DNA” kit (Qiagen Inc, Germany) and quantified spectrophotometrically at 260 nm (Cary 100) (Varian, USA) (Bustin, 2002). GHR mRNA was amplified with the “One step RT-PCR” kit (Qiagen Inc, Germany). This allowed for a semi-quantitative comparison between groups (Bustin, 2002). Specific primers were designed according to coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) complementary DNA sequence (GHR cDNA) (Genbank accession number: AF403539). The forward and reverse GHR primer sequences were: 5'-TACAACTTGCTKATACRGG-3' and 5'-GCATAGTCYCTACACCTMTG-3' respectively. For the RT-PCR procedure, 1 µg of total RNA, 2 µl (1.2 µM) of each primer and the exact amount of all other components were used as described in the “One step RT-PCR” kit protocol (Qiagen Inc, Germany).

GHR cDNA were visualized by ethidium bromide staining under a UV lamp and quantified using a photodocumentation system (Kodak EDAS 290). GHR cDNA was compared to β -actin amplified under the same RT-PCR conditions for each individual and using specific primers (forward: 5'-CCAGAAAGACAGCTAC-3' and reverse: 5'-CCTTGATGTCTCGTCGATTT-3') (Tse et al. 2003).

Statistical analysis

Laboratory-raised fish

Growth rate

Growth rates were determined for the three laboratory-raised groups from the weight data at 12, 16, and 20 months. A hundred and eighty fish were used for each age class, 60 for each experimental group. Significant differences between the slopes (growth rate) of each group were verified using a categorical general linear model (GLM) ($p < 0.05$). Growth rate analyses were performed using SAS 9 (SAS, Heidelberg, Germany). Weight differences at each age class were also verified using an one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey HSD multiple comparison test. Differences were significant when $p < 0.05$.

GH plasma and hepatic levels, glucose concentration and GHR mRNA were compared between laboratory-raised groups using an ANOVA followed by a Tukey HSD multiple comparison test. Prior to statistical analysis, normality of distribution and the effect of weight on growth parameters were verified. Differences were significant when $p < 0.05$.

Fish captured in the wild

GH plasma and hepatic levels, glucose concentration and GHR mRNA obtained for dwarf and normal ecotypes were compared using the one-way Wilcoxon-Mann-Whitney non-parametric test.

All comparisons were performed using SYSTAT 10 software (SPSS, Chicago, USA).

Results

Growth rate

GLM analysis showed a highly significant difference ($p < 0.0001$) for slopes (growth rates) between the three experimental groups (Fig. 1). Normal individuals have a higher growth rate than dwarf and hybrid ones. Although at 12 months, dwarfs have the highest average weight compared to normal and hybrid groups, by 16 months, no difference is observed between the three groups. At 20 months, dwarf and normal individuals are both the same weight and significantly larger than hybrids. Still, calculation of their growth rate at 20 months shows that normal individuals have a higher growth rate than dwarf ones (Tab. 1). Fortin and Gendron (1990) found that for sexually mature individuals, the normal ecotype had a more important growth rate than the dwarf one.

The condition factor (CF) of all individuals raised in the laboratory is around 1 indicating the general health of groups (Tab. 1). Similar results are obtained for the normal ecotype sampled in the wild. The dwarf ecotype, however, has a significantly lower CF ($0,679 \pm 0,008$) than normals ($0,894 \pm 0,011$). This is probably because at the time of sampling dwarf individuals have already rid of their reproductive products. The CF of both males and females may be affected since there is a reduction in weight after spawning while length does not vary.

Plasma GH

No significant differences were found for plasma GH concentrations among the three laboratory-raised groups nor between the mature ecotypes sampled in the wild (Fig. 2).

Plasma glucose

For the laboratory-raised groups, glucose levels for the normal group were significantly lower than the dwarf one, while hybrid levels were intermediate (Fig. 3). No difference concerning plasma glucose was found between dwarf and normal ecotypes sampled in the wild.

Hepatic GH

No significant difference was observed for hepatic GH among the three laboratory groups. Hepatic GH levels, were however significantly lower for the dwarf ecotype sampled in the wild compared to the normal one with levels 20% lower (Fig. 4).

Hepatic GHR mRNA

The comparison of band intensity allowed for a relative semi-quantification of mRNA between groups (Fig. 5a). The intensity of β -actin mRNA is relatively constant between groups indicating that β -actin is good choice for an internal standard. No significant differences were observed in GH receptor mRNA levels in hepatic tissue between the three laboratory-raised groups (Fig. 5b). Conversely, hepatic GH receptor level for the dwarf ecotype sampled in the wild was significantly lower than the normal one, with levels 50% lower (Fig. 5b).

Discussion

Growth rate

In a previous study (using the same experimental groups), it was established that the dwarf group had the highest growth rate compared to the two other groups (normal and hybrid) during their first year of growth under controlled laboratory conditions (Berthelot, 2004). In the present study, we find that the growth rate pattern for the dwarf and normal group, reverses at around 12 months such that the normal group has the highest growth rate. The observed growth pattern reflects that reported for mature fish (Fortin and Gendron, 1990). The exact age, at which the growth rate pattern reversal between ecotypes occurs, had not previously been documented in polymorphic whitefish.

Since the dwarf ecotype mature at approximately two years of age (Fortin and Gendron, 1990), it is not surprising that their growth rate decreases after the first year. When approaching sexually maturity, growth rate usually decreases in fish, as they allocate more energy to reproduction (gametogenesis, spermatogenesis, etc.) (Ali et al., 2003). Our results show that the growth rate for the dwarf group is slowing more rapidly after 12 months (Fig. 1) probably due to a re-investment of energy for gamete production, such that the normal group has the higher growth rate. Since the normal ecotype mature only after 4-5 years (Fortin and Gendron, 1990), it is probable that their growth rate will continue to decline, however will nonetheless remain higher than dwarfs as is observed in the literature for sexually mature fish.

Interestingly at 20 months, hybrid individuals are significantly smaller than the other groups despite a growth rate similar to that of the dwarf group. Because of their mixed parental origins, hybrid could, in theory, have either dwarf and/or normal characteristics. However, taking into consideration that they have a smaller size (Fig. 1, Tab. 1), hybrids seem to take on neither parental characteristics and this is probably an indication of a reduced fitness compared to the pure lake whitefish ecotypes. In the natural environment, the hybrid group may have difficulty in competing for habitats with the

well-adapted limnetic dwarf or well-adapted benthic normal ecotypes (Bernatchez et al., 1999).

Growth regulation by growth hormone axis

Observing no significant difference in GH levels between the laboratory-raised *C. clupearformis* groups and for the sexually-mature ecotypes was unexpected, considering the importance of GH as a growth regulator (Bjornsson et al., 2002) and the known growth rate differences (see above). The ability of exogenous GH (by injection) to increase growth rates has been largely demonstrated in salmonids (Le Bail et al., 1993). Recombinant bovine GH injected coho salmon increase their body size 60 to 100% while uninjected individuals grow only 25% more over a 16-week observation period (McLean et al., 1997). In wild populations, high circulating GH levels for coho salmon have been reported in springtime when growth rates are highest (Duan et al., 1995). A clear relationship between circulating GH and growth rate has also been reported in sea bream from one to 3-year-old fish (Marti-Palanca et al., 1996). In contrast, (Sumpter, 1992) observed higher plasma GH concentrations in a slow-growing rainbow trout strain when compared to a fast-growing one.

Other studies find no significant relationship between plasma GH levels and growth rates (Niu, 1990; Gomez et al., 1996). Valente et al. (2003) report no difference in plasma GH levels between a fast- and slow-growing strain of rainbow trout. In fact, fast growing trout have been found to exhibit episodic and asynchronous GH pulsatility (Gomez et al., 1996). This could explain, at least in part, the difficulty of establishing any significant relationship between growth and GH for *C. clupearformis* groups. Another possibility is the influence of reproductive status. GH levels increase during sexual maturation in both males and females in Atlantic salmon (Bjornsson et al., 1994). In the present study, wild dwarf and normal ecotypes were captured during their spawning period, and high GH levels may be in response to gonad maturation.

In the present study, no coherent relationship between plasma GH and glucose was apparent for laboratory- raised, nor for sexually mature *C. clupearformis*. Farbridge and

Leatherland (1992) report an inverse relationship, where low circulating GH are accompanied by high glucose levels in rainbow trout fed for optimal growth. Our study shows that laboratory-raised normal individuals having the highest growth rate, have the lowest glucose concentration (Fig.3). The authors have no explanation for this result. Interestingly, normal ecotypes found in the wild show a trend for higher plasma glucose levels (Fig. 3), although no apparent relationship with GH exist. In sexually mature ecotypes, the lack of any significance may be accentuated by the reproductive state as glucose levels tend to increase near the spawning period (Kubokawa et al., 1999; Svoboda et al., 2001).

An interesting result from this study is for ecotypes caught in the wild where lower hepatic GH (indicator of relative GH receptor levels) accompanying lower GHR gene expression levels are observed for the wild dwarf ecotype, compared to the normal one (Fig. 4 and 5). This pattern is similar to that observed for fed stunted coho salmon which show low levels of hepatic GH-binding sites with retarded growth (Fryer and Bern, 1979; Gray et al., 1992). In these fish, the condition has been coined «GH-resistance», since low levels of GHR prevent any growth influence from circulating levels of GH which are generally high (Duan et al., 1995). GH insensitivity syndromes have been found in higher vertebrates and associated with dwarfism, such as Laron-type dwarfism in humans (Laron, 1984) and sex-linked dwarfism in chickens (Leung et al., 1984; Hull et al., 1999). In the present study, we did not find elevated GH plasma levels for the dwarf ecotype. Still, low levels of both hepatic GH and GHR gene expression in mature dwarf ecotypes are coherent with the growth regulating mechanism of GH insensitivity dwarfism of higher vertebrates. It remains to be verified whether dwarf individuals actually have high concentrations of plasma GH.

An additional metabolic characteristic of GH insensitivity is significantly reduced nutrient uptake leading to poor growth (Clemmons and Underwood, 1991). Interestingly, dwarf lake whitefish have been found to have a 2-3 times lower food conversion efficiency than normal ecotype (Trudel et al., 2001) providing additional support for the possibility of GH insensitivity. While we did not observe any differences for hepatic GH

and GHR gene expression between laboratory-raised dwarf and normal groups, the recency of their growth rate differences may preclude the development of GH receptor differences. Alternatively an environmental influence, absent under laboratory conditions, may be important for determining the differences in hepatic GH and GHR gene expression observed in wild dwarf or normal ecotypes associated with the littoral or benthic habitat respectively.

GH insensitivity as a growth regulating mechanism in polymorphic lake whitefish remains to be confirmed for the dwarf ecotype. There are nonetheless interesting evolutionary considerations which can be evoked. The ecological constraint which could have led to GH insensitivity in the dwarf ecotype may be related to the high lipid content of prey found in the limnetic habitat (Kainz et al., 2004) and the known metabolic influence of GH on lipids (Sumpter et al., 1991; Perez-Sanchez and Le Bail, 1999). Considering that GH can inhibit lipogenesis and activate lipolysis in adult fish (Perez-Sanchez and Le Bail, 1999; Mommmsen, 2001), high levels of GH may have evolved in response to lipid-rich prey to enable dwarf individuals to produce the necessary free-fatty acids for use as oxidative substrates. A down-regulation of GH receptors, accompanied by other physiological limitations such as a less effective food-conversion capacity for the dwarf ecotype would effectively limit their growth in limnetic habitats.

This study emphasizes the role of the GH regulation in trophic polymorphism of lake whitefish. Although GH-IGF-I axis regulation remains complex, our results show low hepatic GH levels and low expression of GHR gene in dwarf ecotypes which could be similar to the GH resistance syndrome found in other dwarf vertebrates (Laron, 1984; Leung et al., 1984). The growth rate reversal occurring between 0+ (Berthelot, 2004) and 1+ (our study) in laboratory raised dwarf and normal individuals also provides interesting information about life history of lake whitefish growth pattern that was assume before to be linear.

Yet more investigations concerning the importance of GH in lake whitefish trophic polymorphism are need. Because GH receptors frequently presents mutation in Laron

and sex-linked dwarfisms types (Hull et al., 1999), comparison of the GHR cDNA sequences between ecotypes could be an interesting path of study. Also, considering that low IGF-I levels usually accompany GH resistance (Duan et al., 1995), their measurement may add significant knowledge to verify the hypothesis that dwarfism in *C. clupeaformis* is regulated by a GH insensitivity mechanism.

Acknowledgment

We are very grateful to P. East, G. Lacroix, and I. Villemure for their help in the field and O. Côté and F. Boulemkahel for their laboratory contribution. We thank P. Magnan, M.-G. Martinoli, and G. Samson for their comments on the manuscript and Y. Paradis, S. Rouleau and A. Bertolo for statistical advice. This research was funded by an NSERC operating grant to H.G.

References

- Ali, M., Nieceza, A., Wootton, R.J., 2003. Compensatory growth in fishes: A response to growth depression. *Fish. Fish.* 4, 147-190.
- Bernatchez, L., Chouinard, A., Lu, G.Q., 1999. Integrating molecular genetics and ecology in studies of adaptive radiation: Whitefish, Coregonus sp., as a case study. *Biol. J. Linnean Soc.* 68, 173-194.
- Bernatchez, L., Dodson, J.J., 1991. Phylogeographic structure in mitochondrial DNA of the lake whitefish (Coregonus clupeaformis) and its relation to pleistocene glaciations. *Evolution* 45, 1016-1035.
- Bernatchez, L., Vuorinen, J.A., Bodaly, R.A., Dodson, J.J., 1996. Genetic evidence for reproductive isolation and multiple origins of sympatric trophic ecotypes of whitefish (Coregonus). *Evolution* 50, 624-635.
- Berthelot, H., 2004. Croissance des écotypes (0+) nains, normaux et leurs hybrides chez le grand corégone (Coregonus clupeaformis, Mitchill): Implications dans le polymorphisme trophique. Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières.
- Björnsson, B.T., Johansson, V., Benedet, S., Einarsson, I.E., Hildahl, J., Agustsson, T., Jonsson, E., 2002. Growth hormone endocrinology of salmonids: Regulatory mechanisms and mode of action. *Fish Physiol. Biochem.* 27, 227-242.
- Björnsson, B.T., Taranger, G.L., Hansen, T., Stefansson, S.O., Haux, C., 1994. The interrelation between photoperiod, growth hormone, and sexual maturation of adult Atlantic salmon (Salmo salar). *Gen. Comp. Endocrinol.* 93, 70-81.
- Bodaly, R.A., 1979. Morphological and ecological divergence within the lake whitefish (Coregonus clupeaformis) species complex in the Yukon Territory. *Fish. Res. Board Can. Bull.* 36, 1214-1222.
- Bodaly, R.A., Clayton, J.W., Lindsey, C.C., 1988. Status of the Squanga whitefish, Coregonus sp., in the Yukon Territory, Canada. *Can. Field-Nat.* 102, 114-125.
- Bodaly, R.A., Vuorinen, J., Macins, V., 1991. Sympatric presence of dwarf and normal forms of the lake whitefish, Coregonus clupeaformis, in Como Lake, Ontario. *Can. Field-Nat.* 105, 87-90.
- Bush, G.L., 1994. Sympatric speciation in animals - New wine in old bottles. *Trends Ecol. Evol.* 9, 285-288.
- Bustin, S.A., 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* 29, 23-39.

Calduch-Giner, J.A., Mingarro, M., de Celis, S.V.R., Boujard, D., Perez-Sanchez, J., 2003. Molecular cloning and characterization of gilthead sea bream, (Sparus aurata) growth hormone receptor (GHR). Assessment of alternative splicing. Comp. Biochem. Physiol. 136 B, 1-13.

Chouinard, A., Pigeon, D., Bernatchez, L., 1996. Lack of specialisation in trophic morphology between genetically differentiated dwarf and normal forms of lake whitefish (Coregonus clupeaformis Mitchill) in Lac de l'Est, Quebec. Can. J. Zool. 74, 1989-1998.

Clemmons, D.R., Underwood, L.E., 1991. Nutritional Regulation of IGF-I and IGF Binding-Proteins. Annu. Rev. Nutr. 11, 393-412.

Doyon, J.F., Schetagne, R., Verdon, R., 1998. Different mercury bioaccumulation rates between sympatric populations of dwarf and normal lake whitefish (Coregonus clupeaformis) in the La Grande complex watershed, James Bay, Quebec. Biogeochemistry 40, 203-216.

Doyon, J.-F., Bernatchez, L., Gendron, M., Verdon, R., Fortin, R., 1998. Comparaison of normal and dwarf populations of lake whitefish (Coregonus clupeaformis) with reference to hydroelectric reservoirs in northern Quebec. Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol. 50, 97-108.

Duan, C., 1998. Nutritional and developmental regulation of insulin-like growth factors in fish. J Nutr 128, 306S-314S.

Duan, C., Plisetskaya, E.M., Dickhoff, W.W., 1995. Expression of insulin-like growth factor I in normally and abnormally developing coho salmon (Oncorhynchus kisutch). Endocrinology 136, 446-452.

Farbridge, K.J., Leatherland, J.F., 1992. Plasma growth hormone levels in fed and fasted rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) are decreased following handling stress. Fish Physiol. Biochem. 10, 67-73.

Foote, C.J., Wood, C.C., Withler, R.E., 1989. Biochemical genetic comparison of sockeye salmon and kokanee, the anadromous and nonanadromous forms of Oncorhynchus nerka. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 46, 149-158.

Fortin, R., Gendron, M., 1990. Comparative reproduction, growth and morphology of dwarf and normal whitefish Coregonus clupeaformis in the Outardes-2 reservoir (Quebec). Can. J. Zool. 68, 17-25.

Fryer, J.N., Bern, H.A., 1979. Growth hormone binding in tissues of normal and stunted juvenile coho salmon, Oncorhynchus kisutch. J. Fish Biol. 15, 527-533.

- Gomez, J.M., Boujard, T., Fostier, A., Le Bail, P.Y., 1996. Characterization of growth hormone nycthemeral plasma profiles in catheterized rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). J. Exp. Zool. 274, 171-180.
- Gray, E.S., Kelley, K.M., Law, S., Tsai, R., Young, G., Bern, H.A., 1992. Regulation of hepatic growth hormone receptors in coho salmon (Oncorhynchus kisutch). Gen. Comp. Endocrinol. 88, 243-252.
- Hori, M., 1993. Frequency-dependent natural selection in the handedness of scale-eating cichlid fish. Science 260, 216-219.
- Hull, K.L., Marsh, J.A., Harvey, S., 1999. A missense mutation in the GHR gene of Cornell sex-linked dwarf chickens does not abolish serum GH binding. J. Endocrinol. 161, 495-501.
- Kainz, M., Arts, M.T., Mazumder, A., 2004. Essential fatty acids in the planktonic food web and their ecological role for higher trophic levels. Limnol. Oceanogr. 49, 1784-1793.
- Kubokawa, K., Watanabe, T., Yoshioka, M., Iwata, M., 1999. Effects of acute stress on plasma cortisol, sex steroid hormone and glucose levels in male and female sockeye salmon during the breeding season. Aquaculture 172, 335-349.
- Laron, Z., 1984. Laron-type dwarfism (hereditary somatomedin deficiency): a review. Ergeb Inn Med Kinderheilkd 51, 117-150.
- Le Bail, P.Y., Pérez-Sánchez, J., Yao, J., Maisse, G., 1993. Effect of GH treatment on salmonid growth: Study of the variability of response. In: Lahlou, B., Vitiello, P. (Eds.), Aquaculture: fundamental and applied aspects, vol. American Geophysical Union, Washington, DC, p. 173-197.
- Lee, L.T.O., Nong, G., Chan, Y.H., Tse, D.L.Y., Cheng, C.H.K., 2001. Molecular cloning of a teleost growth hormone receptor and its functional interaction with human growth hormone. Gene 270, 121-129.
- Leung, F.C., Taylor, J.E., Steelman, S.L., Bennett, C.D., Rodkey, J.A., Long, R.A., Serio, R., Weppelman, R.M., Olson, G., 1984. Purification and properties of chicken growth hormone and the development of a homologous radioimmunoassay. Gen. Comp. Endocrinol. 56, 389-400.
- Lu, G.Q., Bernatchez, L., 1998. Experimental evidence for reduced hybrid viability between dwarf and normal ecotypes of lake whitefish (Coregonus clupeaformis Mitchell). Proc. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci. 265, 1025-1030.
- Marchant, T.A., Dulka, J.G., Peter, R.E., 1989. Relationship between serum growth hormone levels and the brain and pituitary content of immunoreactive somatostatin in the goldfish, Carassius auratus L. Gen. Comp. Endocrinol. 73, 458-468.

Martinez, R., Estrada, M.P., Berlanga, J., Guillen, I., Hernandez, O., Cabrera, E., Pimentel, R., Morales, R., Herrera, F., Morales, A., Pina, J.C., Abad, Z., Sanchez, V., Melamed, P., Leonart, R., de la Fuente, J., 1996. Growth enhancement in transgenic tilapia by ectopic expression of tilapia growth hormone. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 5, 62-70.

Marti-Palanca, H., Martinez-Barbera, J.P., Pendon, C., Valdivia, M.M., Perez-Sanchez, J., Kaushik, S., 1996. Growth hormone as a function of age and dietary protein: Energy ratio in a marine teleost, the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Growth Regul.* 6, 253-259.

McLean, E., Devlin, R.H., Byatt, J.C., Clarke, W.C., Donaldson, E.M., 1997. Impact of a controlled release formulation of recombinant bovine growth hormone upon growth and seawater adaptation in coho (*Oncorhynchus kisutch*) and chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) salmon. *Aquaculture* 156, 113-128.

McLean, E., Donaldson, E.M., 1993. The role of growth hormone in growth of poikilotherms. In: Schriebman, M.P., Scanes, C.G., Pang, P.K.T. (Eds.), *The endocrinology of growth, development and metabolism in vertebrates*, Academic Press, San Diego, pp. 43-71.

Meyer, A., 1987. Phenotypic plasticity and heterochrony in *Cichlasoma managuense* (Pisces, Cichlidae) and their implications for speciation in cichlid fishes. *Evolution* 41, 1357-1369.

Mommsen, T.P., 2001. Paradigms of growth in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 129 B, 207-219.

Niu, P.D., 1990. Etude du polymorphisme de l'hormone de croissance (GH) chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). In: Université de Rennes I (Ed.), *Université de Rennes I*, Rennes, 118 p.

Perez-Sanchez, J., Le Bail, P.Y., 1999. Growth hormone axis as marker of nutritional status and growth performance in fish. *Aquaculture* 177, 117-128.

Peter, R.E., Marchant, T.A., 1995. The endocrinology of growth in carp and related species. *Aquaculture* 129, 299-321.

Pierce, A.L., Beckman, B.R., Schearer, K.D., Larsen, D.A., Dickhoff, W.W., 2001. Effects of ration on somatotrophic hormones and growth in coho salmon. *Comp. Biochem. Physiol.* 128 B, 255-264.

Rahman, M.A., Maclean, N., 1999. Growth performance of transgenic tilapia containing an exogenous piscine growth hormone gene. *Aquaculture* 173, 333-346.

- Robinson, B.W., Wilson, D.S., Shea, G.O., 1996. Trade-offs of ecological specialization: An intraspecific comparison of pumpkinseed sunfish phenotypes. *Ecology* 77, 170-178.
- Rogers, S.M., Campbell, D., Baird, S.J., Danzmann, R.G., Bernatchez, L., 2001. Combining the analyses of introgressive hybridisation and linkage mapping to investigate the genetic architecture of population divergence in the lake whitefish (Coregonus clupeaformis, Mitchill). *Genetica* 111, 25-41.
- Rogers, S.M., Gagnon, V., Bernatchez, L., 2002. Genetically based phenotype-environment association for swimming behavior in lake whitefish ecotypes (Coregonus clupeaformis Mitchill). *Evolution* 56, 2322-2329.
- Sakamoto, T., Hirano, T., 1991. Growth hormone receptors in the liver and osmoregulatory organs of rainbow trout - Characterization and dynamics during adaptation to seawater. *J. Endocrinol.* 130, 425-433.
- Schluter, D., McPhail, J.D., 1993. Character displacement and replicate adaptive radiation. *Trends Ecol. Evol.* 8, 197-200.
- Scott, W.B., Crossman, E.J., 1974. Poissons d'eau douce du Canada. Office de recherches sur les pêcheries du Canada, Ottawa. Bulletin 184.1026 p.
- Skulason, S., Smith, T.B., 1995. Resource polymorphisms in vertebrates. *Trends Ecol. Evol.* 10, 366-370.
- Smith, T.B., 1993. Disruptive selection and the genetic-basis of bill size polymorphism in the African finch *Pyrenestes*. *Nature* 363, 618-620.
- Smith, T.B., Skulason, S., 1996. Evolutionary significance of resource polymorphisms in fishes, amphibians, and birds. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 27, 111-133.
- Sumpter, J.P., 1992. Control of growth of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Aquaculture* 100, 299-320.
- Sumpter, J.P., Le Bail, P.Y., Pickering, A.D., Pottinger, T.G., Carragher, J.F., 1991. The effect of starvation on growth and plasma growth hormone concentrations of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. *Gen. Comp. Endocrinol.* 83, 94-102.
- Svoboda, M., Kouril, J., Hamackova, J., Kalab, P., Savina, L., Svobodova, Z., Vykusova, B., 2001. Biochemical profile of blood plasma of tench (Tinca tinca L.) during pre- and postspawning period. *Acta Vet. Brno* 70, 259-268.
- Thissen, J.P., Underwood, L.E., Ketelslegers, J.M., 1999. Regulation of insulin-like growth factor-I in starvation and injury. *Nutr. Rev.* 57, 167-176.

Trudel, M., Tremblay, A., Schetagne, R., Rasmussen, J.B., 2001. Why are dwarf fish so small? An energetic analysis of polymorphism in lake whitefish (Coregonus clupeaformis). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 58, 394-405.

Tse, D.L.Y., Tse, M.C.L., Chan, C.B., Deng, L., Zhang, W.M., Lin, H.R., Cheng, C.H.K., 2003. Seabream growth hormone receptor: molecular cloning and functional studies of the full-length cDNA, and tissue expression of two alternatively spliced forms. Biochim. Biophys. Acta-Gene Struct. Expression 1625, 64-76.

Valente, L.M.P., Le Bail, P.Y., Gomes, E.F.S., Fauconneau, B., 2003. Hormone profile in fast- and slow-growing strains of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) in response to nutritional state. Aquaculture 219, 829-839.

Wagner, G.F., McKeown, B.A., 1986. Development of a salmon growth hormone radioimmunoassay. Gen. Comp. Endocrinol. 62, 452-458.

Wargelius, A., Fjellidal, P.G., Benedet, S., Hansen, T., Bjornsson, B.T., Nordgarden, U., 2005. A peak in GH-receptor expression is associated with growth activation in Atlantic salmon vertebrae, while upregulation of IGF-I receptor expression is related to increased bone density. Gen. Comp. Endocrinol. 142, 163-168.

Westerberhard, M.J., 1989. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. Annu. Rev. Ecol. Syst. 20, 249-278.

Table 1. Morphometric measurements, coefficient factor and growth rate of laboratory-raised and wild lake whitefish. At the time of sampling, the laboratory-raised individuals were 20 month-old, whereas wild individuals were mature. Each value represents the mean \pm SE. Statistical differences were tested among the same raising type and are represented by different letters.

	n	Body weight (g)	Total length (mm)	CF *	Growth rate **
Laboratory-raised					
Dwarf	43	45,96 \pm 0,22 a	176,11 \pm 0,21 a	0,804 \pm 0,001 a	0,216 a
Hybrid	35	32,91 \pm 0,16 b	154,48 \pm 0,28 b	0,868 \pm 0,001 b	0,216 a
Normal	41	54,55 \pm 0,26 a	173,88 \pm 0,26 a	0,987 \pm 0,001 c	0,249 b
Wild					
Dwarf	6	35,58 \pm 0,36 a	173,83 \pm 0,53 a	0,679 \pm 0,008 a	N/A
Normal	5	613,38 \pm 17,48 b	407,40 \pm 4,42 b	0,894 \pm 0,011 b	N/A

* CF = 100 x (Body weight (g) / (Body length (cm))³).

** Growth rate was calculated with the following formula: $M_t = M_0 e^{gt}$, where (g) is the growth rate, (M_t) is the weight of the individual at time t (20 month-old), (M_0) represents the initial weight at 12 months, and (t) the total growth period (8 months in this case).

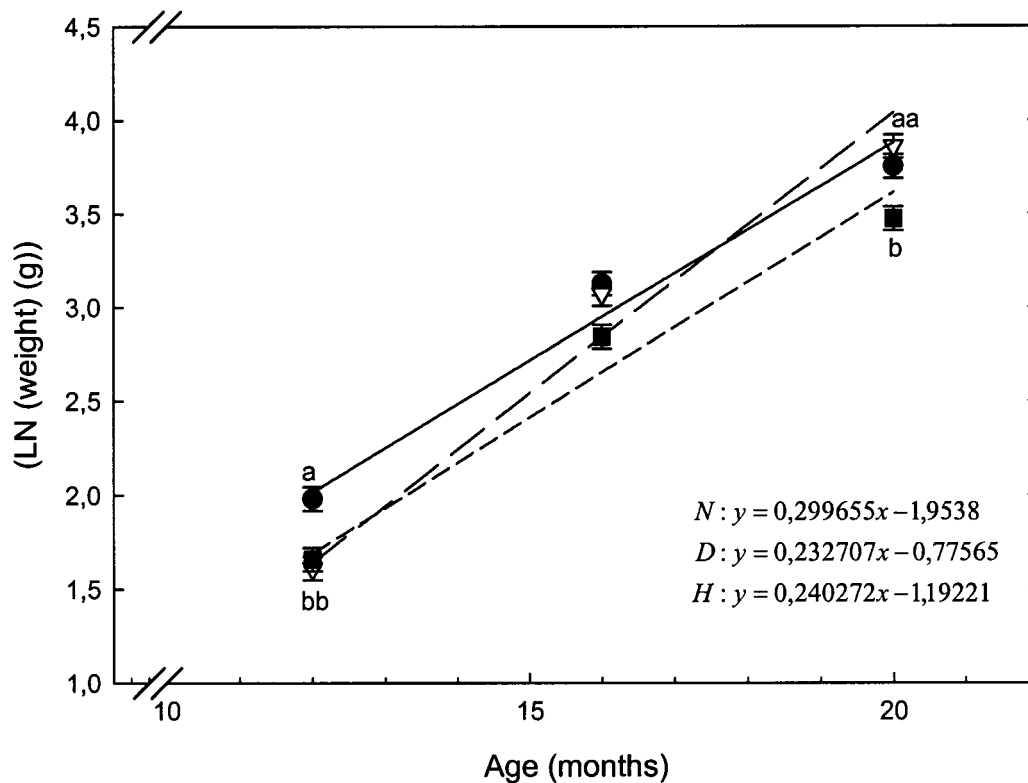


FIGURE 1 Growth rate of laboratory-raised *C. clupearformis* groups during their second year (from 12 to 20 months) of growth. Regressions and equations are included for each group where slopes represent growth rate ($p < 0.05$). Solid line is for dwarf individuals, long dash line is for normal ones and short dash line is for the hybrid individuals. At each age class, mean weight \pm standard deviation is presented. Circles represent the dwarf individuals, triangles are the normal one, and squares, the hybrids. Significant differences between weights ($p < 0.05$) are indicated by different letters.

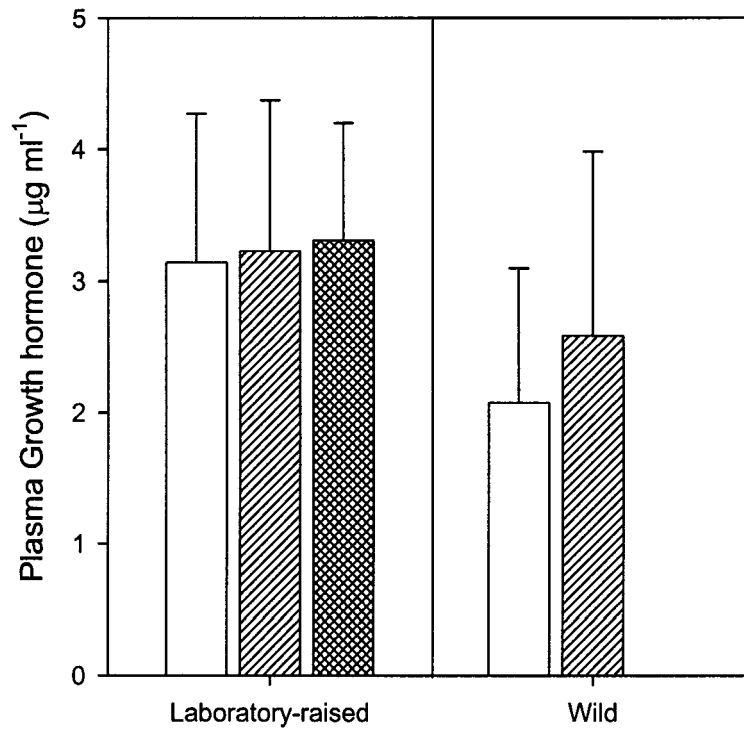


FIGURE 2 Plasma growth hormone (GH) levels of 20 month-old laboratory-raised groups and of mature wild ecotypes of *C. clupeaformis*. White band represents dwarf individuals, striped band for the normal ones and cross-hatched band for the hybrid ones. Means \pm standard errors are presented.

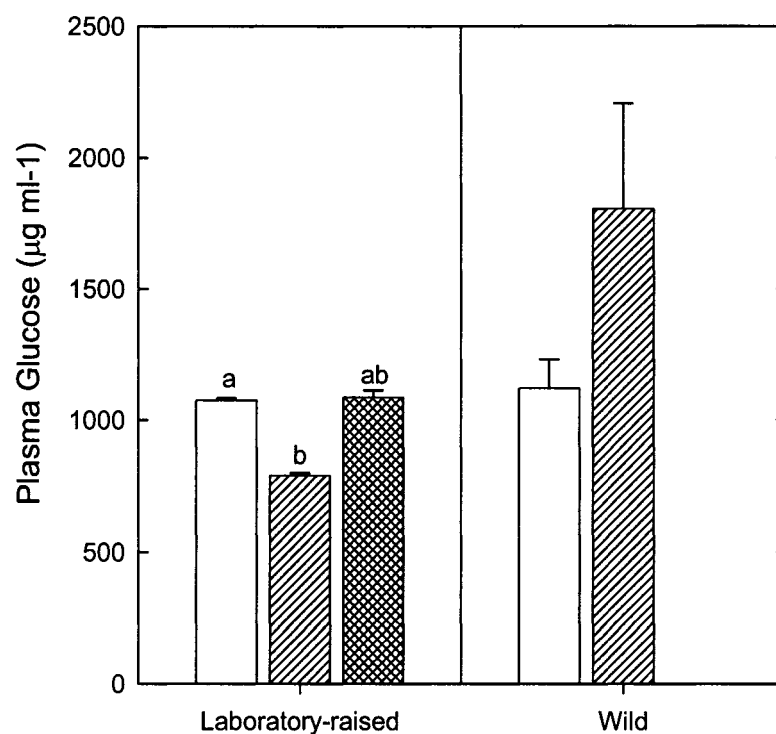


FIGURE 3 Plasma glucose levels of 20 months-old laboratory-raised groups and of mature wild ecotypes of *C. clupeaformis*. White band represents dwarf individuals, striped band for the normal ones and cross-hatched band for the hybrid ones. Significant differences ($p < 0.05$) are indicated by different letters. Means \pm standard errors are presented.

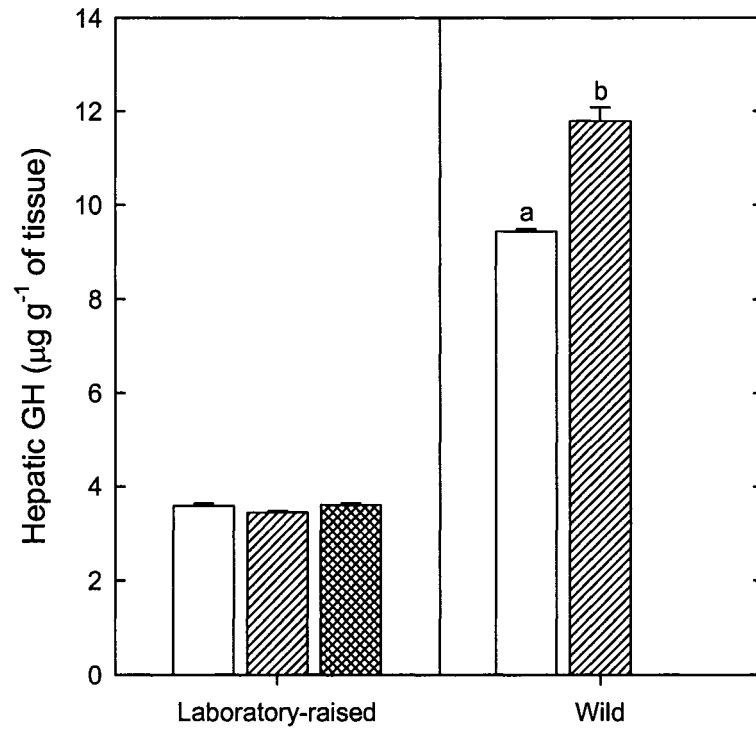


FIGURE 4 Hepatic growth hormone (GH) levels of 20 months-old laboratory-raised groups and of mature wild ecotypes of *C. clupeaformis*. White band represents dwarf individuals, striped band for the normal ones and cross-hatched band for the hybrid ones. Significant differences ($p < 0.05$) are indicated by different letters. Means \pm standard errors are presented.

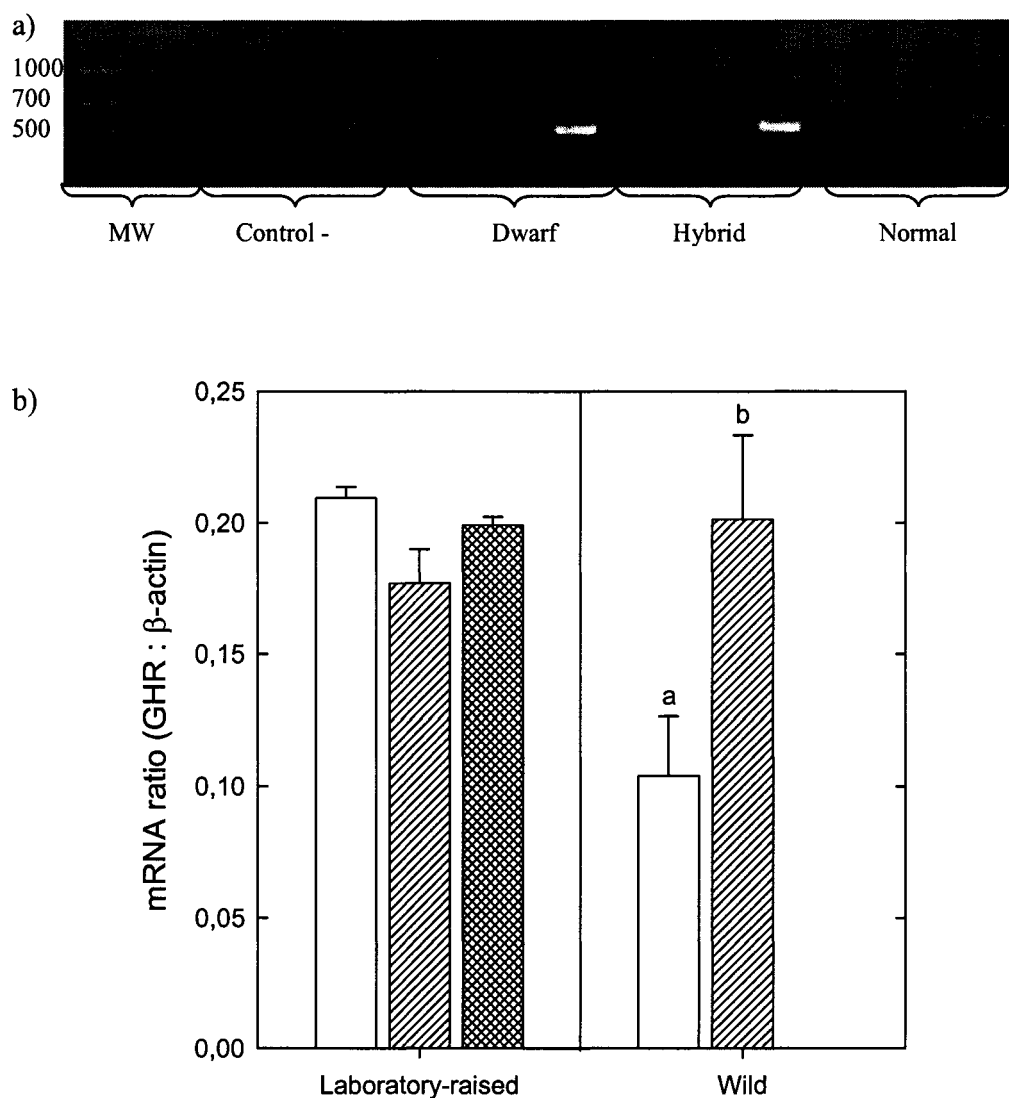


FIGURE 5 Hepatic growth hormone receptor (GHR) mRNA levels: Amplifications on agarose gel (a) and hepatic GHR mRNA levels of 20 months-old laboratory-raised groups and of mature wild ecotypes of *C. clupearformis* (b). White band represents dwarf individuals, striped band for the normal ones and cross-hatched band for the hybrid ones. Significant differences ($p < 0.05$) are indicated by different letters. Means \pm standard errors are presented.

ANNEXE I

Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology Guide for authors

Guide for Authors

COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY

Aims and scope of CBP

The journal publishes original articles emphasizing comparative and environmental aspects of the physiology, biochemistry, molecular biology, pharmacology, toxicology and endocrinology of animals. Adaptation and evolution as organizing principles are encouraged. Studies on other organisms will be considered if approached in a comparative context.

Part A. Molecular and Integrative Physiology deals with molecular, cellular, integrative, and ecological physiology. Topics include bioenergetics, circulation, development, excretion, ion regulation, endocrinology, neurobiology, nutrition, respiration, and thermal biology. Studies on regulatory mechanisms at any level or organization such as signal transduction and cellular interactions and control of behaviour are encouraged.

Part B. Biochemistry and Molecular Biology covers biochemical and molecular biological aspects of metabolism, enzymology, regulation, nutrition, signal transduction, promoters, gene structure and regulation, metabolite and cell constituents, macromolecular structures, adaptational mechanisms and evolutionary principles.

Part C. Toxicology and Pharmacology is concerned with chemical and drug action at different levels of organization, biotransformation of xenobiotics, mechanisms of toxicity, including reactive oxygen species and carcinogenesis, endocrine disruptors, natural products chemistry, and signal transduction. A molecular approach to these fields is encouraged.

Naturally, a certain degree of overlap exists between the different sections, and the final decision as to where a particular manuscript will be published after passing the rigorous review process lies with the editorial office.

Submission and review of manuscripts

All manuscripts (one original plus three copies) must be submitted to the editors:

The Editors, CBP Editorial Office, University of British Columbia, 1153 -- 2111 Lower Mall, Vancouver BC, Canada V6T 1Z4.

Authors should provide names and addresses (including phone and fax numbers and e-mail address) of at least four researchers of recognized competence who may be considered as reviewers. Authors are requested to select an appropriate section and suggest an associate editor of CBP.

Every manuscript is independently reviewed by at least two referees. Rapid turn-around will be encouraged by use of fax and e-mail transmission. Based on these reports, a decision regarding publication, revision or rejection is taken.

Review articles

Before writing their manuscripts, potential authors of review articles should contact one of the Editors who, after consultations with the other editor and/or members of the Editorial Board, will provide feedback on suitability of the topic. Reviews should be topical, and serve as critical appraisals of areas of research. They should provide an up-to-date analysis of concepts and point out future directions. For manuscript preparation, follow the instructions below.

Online submission of papers

Authors are encouraged to submit their manuscripts to the CBP office electronically, by using the EISubmit submission tool at <http://www.elsubmit.com/submit/cbpsubmit>. After registration, authors will be asked to upload their article and associated artwork. The submission tool will generate a PDF file to be used for the reviewing process.

Full instructions on how to use the online submission tool are available at the above web address.

Colour: Colour figures are published at the author's expense. However, a limited number of colour illustrations may be included, free of charge, at the discretion of the editors.

Revision of manuscripts: Revised manuscripts must be submitted within two months of the authors' receipt of the referees' reports. Otherwise they will be considered as new submissions.

Proofs: The corresponding author will receive proofs by e-mail or post. Proofs must be checked immediately and returned to Elsevier. Corrections to the proofs should be restricted to printer's errors only. Substantial alterations may be charged to the author. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete.

Reprints: The corresponding author will receive **twenty five offprints free of charge**. Additional offprints may be purchased using the order form accompanying the proofs.

Page charges: **CBP has no page charges.**

Preparation of manuscripts

Sections: Manuscripts should be subdivided into the following sections: Title page, abstract, introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgements, references, captions to figures, tables.

Format: All sections of the manuscript must be double-spaced with 2.5 cm (1 inch) margins. Pages should be numbered consecutively. Avoid footnotes. Underline only words or letters that will be printed in italics. Mark the position of each figure and table in the margin. The full Latin name of all species used in the study must be supplied.

Title page: The title should be short, concise and informative. Consult a recent issue of CBP for author format. The author's name should be followed by his/her department, institution, city, and country. Indicate the author to whom correspondence and proofs should be addressed, and supply full postal address as well as phone and fax numbers, and an e-mail address. Please provide a running title of not more than 45 characters. If submitting a review article, write "REVIEW" at the top of the title page.

Abstract: The second page of the manuscript must contain only the abstract and the key words. The abstract should be a single paragraph not exceeding 200 words. Non-standard abbreviations and reference citations should be avoided.

Key words: Up to eight key words, which may or may not appear in the title, should be listed in alphabetical order after the abstract. Only these key words, together with the title, will be used to compile the subject index.

References:

1. All publications cited in the text should be presented in alphabetical order in a list following the text of the manuscript.
2. In the text refer to the author's name and year of publication.
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". In this list names of first authors and all co-authors should be mentioned.
4. References cited together in the text should be arranged chronologically.
5. The List of references should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. Names of all authors must be included. *Do not use et al.* Publications by the same

author(s) in the same year should be listed as 2000a, 2000b, etc.
Follow the relevant examples below.

References to books, book chapters and journals should be as follows:

Axelsson, M., Farrell, A.P., 1993. Coronary blood flow in vivo in the coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*).
Am. J. Physiol. 264, R963 - 971.
Bond, C.E., 1979. Biology of Fishes. Saunders Publ., Philadelphia, PA.
Bowden, L.A., Rainger, G.E., Holland, J.W., Knight, J., Secombes, C.J., Rowley, A.F., 1997. Generation and characterization of monoclonal antibodies against rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*), leucocytes. Comp. Biochem. Physiol. 117C, 291 - 298.
Collie, N.L., Ferraris, R.P., 1995. Nutrient fluxes and regulation in fish intestine. In: Hochachka, P.W., Mommsen, T.P. (Eds.), Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, vol. 4. Metabolic Chemistry. Elsevier, Amsterdam, pp. 221 - 239.

Tables: Tables should be prepared for direct camera copy or clearly typed as follows: (a) Refer to current tables in the journal, for required spatial layout. If possible, a laser printer with a Times Roman font should be used.

(b) Each table, including heading and legend should be typed on a separate sheet.

(c) Insert heavy rules at the head and foot of each table, and fine rules below column headings.

Italics: Genus and species names, and other words normally italicized, should be typed in italics or underlined. **Do not use italics in the references.**

Illustrations: Photographs, charts and diagrams are to be referred to as "figs" and should be ordered consecutively.

Computer Disks: CBP uses electronic files for speed and accuracy of production. Authors will receive full instructions on disk types, formatting etc. with the letter of provisional acceptance from the editorial office. If you are not submitting online, please observe the following criteria:

1. Send only hard copies when first submitting your manuscript.
2. The electronic file should include all textural material (text, references, tables, figure captions, etc.). Use separate illustration files, if available.
3. The file should use the wrap-around end-of-the-line feature, i.e., returns at the end of paragraphs only. Place two returns after every element such as title headings, and paragraphs.
4. Make sure the disk does not contain a virus.
5. Keep a back-up disk for reference and safety.

Authors in Japan please note: Upon request, Elsevier Science K.K. will provide authors with a list of people who can check and improve the English of their paper (*before submission*). Please contact our Tokyo Office: Elsevier Science K.K., 9-15 Higashi-Azabu 1-chrome, Minato-ku, Tokyo 106-0044, Japan. Tel.: +81-3-55615032; Fax: +81-3-55615045; e-mail: info@elsevier.co.jp

Instructions regarding GenBank/DNA Sequence Linking:

DNA sequences and GenBank Accession numbers: Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in **bold, underlined text**. Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example 1 below). This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example 1: "GenBank accession nos. **AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.**

In the final version of the **printed article**, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).

Example 2: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228, a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

In the final version of the **electronic copy**, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

Instructions regarding GenBank/DNA Sequence Linking:

DNA sequences and GenBank Accession numbers: Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in **bold, underlined text**. Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example 1 below). This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example 1: "GenBank accession nos. **AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.**

In the final version of the **printed article**, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).

Example 2: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228, a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

In the final version of the **electronic copy**, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

Summary of requirements

1. Submit four (4) copies of the manuscript - one containing the original artwork, plus three copies. Reduce volume by using two-sided print for the three copies. Suggest the appropriate section of CBP and associate editor.
2. Double-space everything everywhere, leaving 1 inch (2.5 cm) margins.
3. Designate the corresponding author and provide telephone and fax numbers, and an e-mail address.
4. Include a running title of less than 45 letters and spaces.
5. Provide an abstract of less than 200 words; append up to eight key words to the abstract page.
6. Check the style in which references are cited; unpublished work will not be listed in this section unless it is "in press".

7. If referencing manuscripts "in press", enclose two copies each of these manuscripts if considered critical to the refereeing process.
8. Provide names and addresses (including phone and fax numbers & e-mail addresses) of at least four researchers of recognized competence who may be considered as referees.

Author enquiries

Visit the Author Gateway from Elsevier Science (<http://authors.elsevier.com>) for the facility to track accepted articles and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. The Author Gateway also provides detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more.

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided when an article is accepted for publication, by Elsevier.

September 2002 version